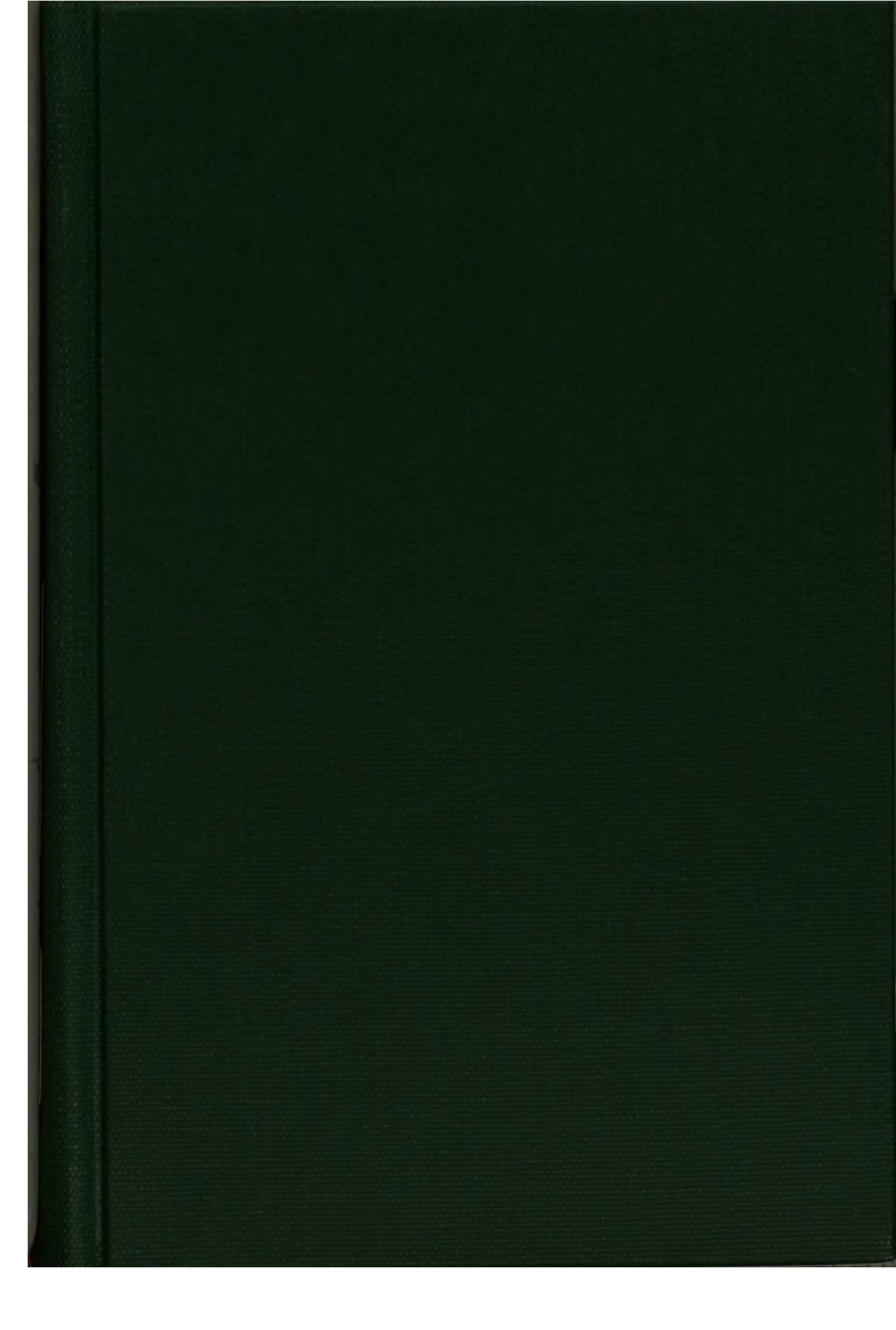
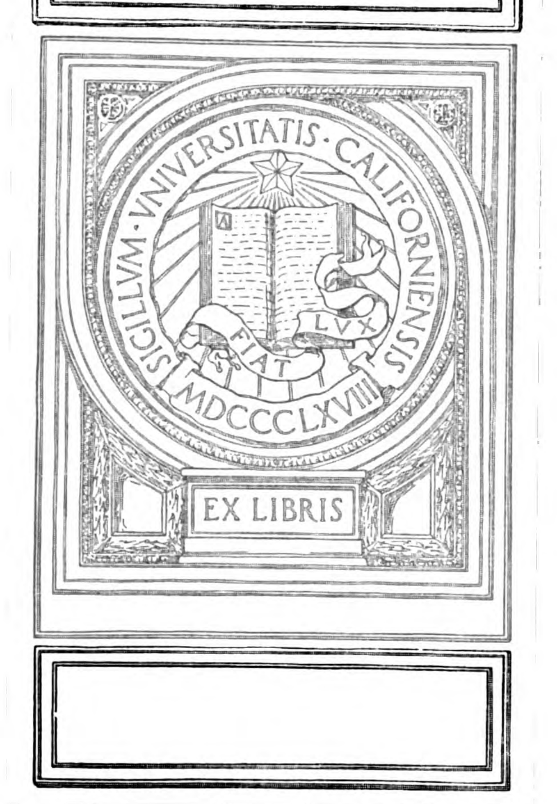



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS









Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

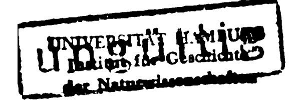
C. Neuberg-Berlin

159

Hundertneunundfünfzigster Band



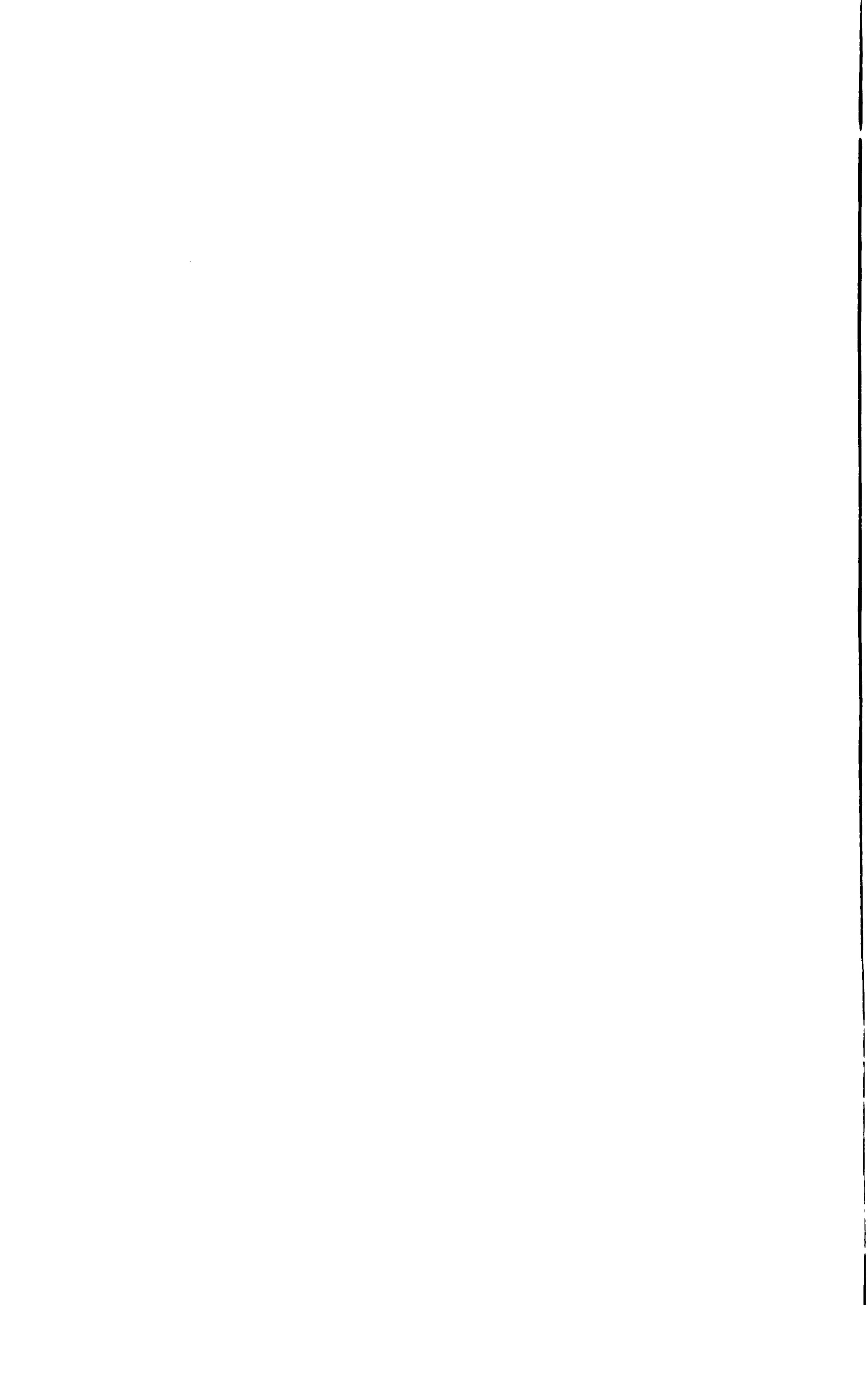
Berlin
Verlag von Julius Springer
1925



Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Seite



Versuche zur Reinigung der Oxynitrilese und einige Eigenschaften derselben.

Von

E. Nordefeldt.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Zu meinen früher in drei Aufsätzen[1]) veröffentlichten Versuchen über die Bedeutung des „Emulsins" bei der asymmetrischen Synthese des Benzoxynitrils aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff wird hier eine neue Untersuchung über die Oxynitrilese gefügt. Ich bezeichne hier die unbekannte (vermutlich enzymatische) Substanz, welche die Bildung von asymmetrischem Oxynitril bewirkt, als *Oxynitrilese.* Damit soll nur ausgedrückt werden, daß das Enzym durch die asymmetrisch synthetische Wirkung charakterisiert wird. Die Frage, ob an dieser Wirkung eine asymmetrische *Spaltung* beteiligt ist, soll durch diese Bezeichnung, welche den Vorzug der Einfachheit hat, nicht berührt werden.

Ich werde im folgenden über mehrere Methoden berichten, wodurch eine Reinigung der Oxynitrilese in den Präparaten erzielt wird. Mit den reinsten, so gewonnenen Präparaten habe ich einige Eigenschaften dieses Katalysators studiert. Speziell habe ich Versuche über die Kinetik der Oxynitrilbildung angestellt und auch versucht, das Molekulargewicht des Enzyms angenähert zu bestimmen.

Am Ende des Aufsatzes findet man eine kurze Zusammenfassung der in dieser und meinen drei früheren Arbeiten gewonnenen Resultate.

I. Herstellung des Rohpräparats.

Als Rohpräparat bezeichne ich ein durch Acetonfällung von Mandelextrakt erhaltenes Pulver.

1. Die Acidität bei der Extraktion.

Ich hatte gefunden, daß Wasser, mit ein wenig Alkali versetzt, viel mehr Substanz aus den Bittermandeln auslöst als angesäuertes Wasser. Selbstverständlich ist damit nicht gesagt, daß auch *mehr Enzym*

[1]) Diese Zeitschr. **118**, 15, 1921; **131**, 390, 1922; **137**, 489, 1923.

durch Alkali herausgelöst wird. Es war indessen notwendig, eine Acidität ausfindig zu machen, bei der die Extraktion eine Flüssigkeit ergab, die nach Acetonfällung das bestmögliche Enzympräparat lieferte.

Bittermandeln wurden während drei Minuten in 70gradigem Wasser gehalten, dann schnell gekühlt, geschält und in der Mühle gerieben. Das Pulver wurde durch Pressen zwischen Filtrierpapier von einem Teile des Fettes befreit, danach einige Male mit Äther gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet.

Proben von 20 g wurden jetzt während einiger Stunden mit gleichen Mengen (200 ccm) Wasser geschüttelt. Verschiedene Aciditäten wurden durch Zusatz von Ammoniak oder Essigsäure eingestellt. Nach Filtration wurden von jedem Extrakt 80 ccm genommen und mit je 200 ccm Aceton gefällt. Die Niederschläge wurden getrocknet und gewogen. Die Gewichte findet man in der Tabelle I (A). Die übriggebliebenen Teile der Extrakte wurden mit Essigsäure bzw. Ammoniak zu derselben Acidität gebracht: p_H war nach der kolorimetrischen Bestimmung 4,5. Die dabei entstandenen Niederschläge zeigten sich enzymatisch unwirksam und wurden verworfen. Von den Filtraten wurden 80 ccm genommen und wie oben mit Aceton gefällt. Die Niederschläge wurden getrocknet und gewogen (B in der Tabelle I).

Es wurde nun die Wirksamkeit der Pulver bestimmt. Von den A-Präparaten nahm ich 0,35 g, von den B-Präparaten 0,165 g, und setzte dazu 5 ccm Wasser. Nach 24 Stunden wurde die Reaktionsmischung hinzugesetzt. Diese bestand aus 1 ccm Benzaldehyd + 22,2 ccm (äquivalente Menge) HCN-Lösung (Alkohol: 60 Volumprozent) + 5 ccm Acetatpuffer (molare Lösung). In dieser Mischung war p_H 5,2. Der Aldehyd war mittels $NaHCO_3$ und Destillation von Benzoesäure befreit. Nach einer Stunde wurde der Eiweißniederschlag, der enzymatisch inaktiv war, abfiltriert und danach der Zuwachs der Rechtsdrehung beobachtet (2 dm Rohr, Na-Licht). Nach etwa 3 Stunden hatte die Drehung ihr Maximum erreicht und nahm danach langsam ab, um nach etwa 100 Stunden Null zu werden. Die Drehungsmaxima findet man in der folgenden Tabelle I.

Tabelle I.

Nr.	Extraktionsflüssigkeit	A		B	
		Gewicht des Niederschlags g	Drehung	Gewicht des Niederschlags g	Drehung
1	180 ccm Wasser + 20 ccm konz. NH_3	2,5	0,45°	1,2	0,50°
2	185 ccm Wasser + 15 ccm konz. NH_3	2,3	0,50	1,0	0,50
3	190 ccm Wasser + 10 ccm konz. NH_3	2,3	0,50	1,0	0,50
4	195 ccm Wasser + 5 ccm konz. NH_3	2,0	0,50	1,1	0,45
5	200 ccm Wasser + 0 ccm konz. NH_3	0,6	0,60	0,7	0,60
6	195 ccm Wasser + 5 ccm Eisessig	0,4	0,90	0,2	1,00

Den relativen Reinheitsgrad der Präparate können wir vorläufig folgendermaßen ausdrücken (siehe unten Abt. II, 1 und V, A):

$$\text{Rel. Reinheitsgrad} = \frac{\text{Drehung}}{\text{g Enzympräparat in der Reaktion}}.$$

Die Ausbeute wird dann durch den Ausdruck:

$$\text{Ausbeute} = \text{g Niederschlag} \cdot \frac{\text{Drehung}}{\text{g Enzympräparat in der Reaktion}}$$

ausgedrückt. Stelle ich diese Zahlen für die verschiedenen Niederschläge zusammen, ergibt sich folgende Tabelle II:

Tabelle II.

Nr.	A		B	
	Reinheitsgrad	Ausbeute	Reinheitsgrad	Ausbeute
1	1,3	3,3	3,0	3,6
2	1,4	3,2	3,0	3,0
3	1,4	3,2	3,0	3,0
4	1,4	2,8	2,8	3,1
5	1,7	1,0	3,6	2,5
6	2,6	1,0	6,1	1,2

Es ist aus dieser Tabelle leicht zu sehen, daß das günstigste Resultat in den Versuchen B 1, 2 und 3 erreicht wurde. Das beste Verfahren ist also, das Enzym (mit viel Eiweiß und dergleichen) mit Alkali zu extrahieren und danach mit Säure das damit fällbare Eiweiß zu entfernen. Da bei der Extraktion saure Substanzen (unter anderen Benzoesäure) gebildet werden, muß ab und zu ein wenig Alkali zugefügt werden. Die Extraktion wurde gewöhnlich über einen Tag und eine Nacht ausgedehnt.

2. Einfluß des Fettgehaltes der Mandeln.

Da es möglich erschien, daß aus schon vorher von Fett befreiten Mandeln ein besseres Enzympräparat dargestellt werden könnte, wurden einige Versuche über die Fettextraktion ausgeführt.

A. Aus 300 g Mandeln wurde durch alkalische Extraktion und Acetonfällung ein Roh-Enzym gewonnen. Beim Trocknen wurde viel Öl ausgeschieden, das durch mehrmaliges Waschen mit Aceton entfernt wurde. Das trockene Pulver wog 40 g.

B. 300 g Mandeln wurden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Sie wogen dann 160 g. Daraus wurde wie früher ein Rohpräparat mit einem Gewicht von 43 g gewonnen.

C. Die Extraktion wurde jetzt mit Aceton vorgenommen, wonach 170 g Substanz zurückblieben. Das daraus dargestellte Enzympräparat wog 42 g.

Da diese drei Präparate die gleiche enzymatische Wirkung zeigten, ist die Ausbeute und die Reinheit also etwa dieselbe. Die Fettextraktion

führt also keinen Verlust oder Gewinn mit. Da indessen viel Aceton oder Äther zum Wegwaschen des Öles nötig ist, wurden alle im folgenden beschriebenen Präparate aus einem beinahe fettfreien, feingemahlenen Pulver hergestellt, das unter dem Namen „Placent Amygdalar. amar." im Handel vorkommt.

3. Die Acetonfällung.

Eine Lösung von Roh-Enzym wurde mit 1 Volumen Aceton versetzt, der Niederschlag abfiltriert und getrocknet und das Filtrat mit 9 Volumina Aceton versetzt. Dabei wurde nochmals ein Niederschlag erzeugt, der abfiltriert und getrocknet wurde. Von den zwei Niederschlägen wurde 0,1 g auf enzymatische Wirksamkeit geprüft. Der letzte Niederschlag war mehr als dreimal kräftiger. Bei Fällung mit geringen Acetonmengen fallen also hauptsächlich inaktive Beimengungen aus.

Ich stellte jetzt 200 ccm einer 3,68proz. Lösung von Roh-Enzym her, wozu steigende Mengen Aceton gefügt wurden. Wenn 150 ccm Aceton zugesetzt waren, wurde die Flüssigkeit trübe. Mit noch 200 ccm Aceton wurde nun ein großer Niederschlag erzeugt, der abfiltriert und getrocknet wurde. Von dem Filtrat, das durch mehr Aceton keinen weiteren Niederschlag gab, wurden 270 ccm bei vermindertem Druck und bei 30° auf 65 ccm eingeengt. Von der konzentrierten Lösung wiesen 10 ccm in der Substratmischung von 27,2 ccm keine wahrnehmbare Drehung auf und enthielten folglich kein Enzym. Durch Zusatz von 1,5 bis 2 Volumina Aceton wird also alles Enzym gefällt, und überschüssiges Aceton hat nur die Wirkung, daß sich der Niederschlag schneller bildet und leichter filtriert.

In diesem Zusammenhang will ich bemerken, daß ein kräftiger Niederschlag immer entsteht, wenn *rohe* Enzymlösung mit dem Substrat vermischt wird. Es ist indessen für die Ausbildung der Rechtsdrehung belanglos, ob dieser Niederschlag abfiltriert wird oder während der Reaktion in der Flüssigkeit verbleiben darf. So konnte auch eine Rohemulsinlösung vollständig durch cyanwasserstoffhaltigen Alkohol gefällt werden, ohne daß das Enzym ausgefällt wurde.

II. Reinigung des Roh-Emulsins.

1. Dialyse.

Roh-Emulsin wurde mit Wasser geschüttelt, wobei ein kleiner unwirksamer Rest abfiltriert und verworfen wurde. Das Filtrat wurde mit Toluol versetzt und in großen Kollodiumschläuchen während einer Woche gegen fließendes Wasser dialysiert. Dabei setzte sich auf dem Boden der Schläuche ein weißer Niederschlag ab, der indessen enzymatisch unwirksam war.

Das Trockengewicht der ursprünglichen Lösung betrug 2,18 Proz. und ihr Aschengehalt 0,13 Proz. Die dialysierte Lösung war 1,26proz. und hatte den Aschengehalt 0,02 Proz. Durch mehrere Versuche mit

beiden Lösungen wurde gefunden, daß die Dialyse keine Abnahme der Wirksamkeit mitgeführt hatte. Dies wurde so untersucht, daß in zwei Reaktionsmischungen von je 1 ccm Aldehyd, der äquivalenten Mengen Cyanwasserstoff, Acetatpuffer zur optimalen Acidität und 2,5 ccm von jeder Enzymlösung zum Totalvolumen 18 ccm, die Maximaldrehungen (0^0, 80 und 0^0, 80 bzw.) und die totale Synthese (etwa 95 Proz.) beobachtet wurden. Hieraus berechnen sich die spezifischen Drehungen der beiden Oxynitrillösungen zu je $5,1^0$. Um einen zahlenmäßigen Ausdruck für den Reinheitsgrad zu bekommen, verfahren wir folgendermaßen: Die in den Substratgemischen beobachtete Rechtsdrehung ist der Enzymmenge proportional (siehe weiter unten V, A) und kann also als Maß der Enzymmenge dienen. Nun ist indessen in den verschiedenen Versuchen aus äußeren Gründen die Verdünnung der Substrate nicht ganz dieselbe, aber da die Totalsynthese in sämtlichen Fällen beinahe die gleiche ist, können wir als Maß der Enzymmenge die *spezifische Drehung* des Oxynitrils wählen. Wir finden dann: $\text{Reinheitsgrad} = \frac{\text{sp. Drehung}}{\text{g Enzympräparat}}$. Der Reinheitsgrad berechnet sich daraus für das Rohpräparat zu 100 und für das durch Dialyse gereinigte zu 165. Durch einfache Dialyse kann also eine beträchtliche Erhöhung des Reinheitsgrades erzielt werden. (Daß die lange Dialysezeit an sich keine Zerstörung bewirken kann, wird dadurch bewiesen, daß dialysierte Enzymlösungen, mit Toluol versetzt, bei Zimmertemperatur während Monaten ohne nennenswerte Abnahme der Wirksamkeit aufbewahrt werden können.)

Versuche, die dialysierte Lösung mit Alkohol oder Äther zu fällen, scheiterten aus dem Grunde, daß der kleine Niederschlag nicht in filtrierbarer Form ausfiel. Erst beim Zusatz eines geeigneten Elektrolyten wurde das Enzym wirklich gefällt. Die Reinigung durch Dialyse und Fällung ist also ohne Zusatz von z. B. $MgSO_4$ unmöglich, und der Zweck der ersten Dialyse wird ja dadurch verfehlt. Übrigens zeigte ein auf diese Weise gewonnenes Präparat einen Reinheitsgrad, der nicht größer war als derjenige der nur einmal dialysierten Lösung.

2. Fraktionierte Fällung mit Säure.

Von der großen Menge inaktiver Substanz, die bei der alkalischen Extraktion mit dem Enzym in Lösung geht, kann ein wesentlicher Teil mit Säure beseitigt und dann das Enzym mit Aceton ausgefällt werden. So wurden z. B. 400 g Placent mit 2 Liter Wasser angerührt und danach in kleinen Portionen 60 ccm 2 n Natronlauge zugesetzt. Die Mischung wurde während 24 Stunden gerührt, dann mit 120 ccm n Essigsäure gemischt und schließlich filtriert. Vom Filtrat wurden 1,5 Liter mit 4,5 Liter Aceton gefällt. Der Niederschlag wog trocken

30 g. Dies Präparat war wirksamer und in der Farbe weißer als das mit Wasser extrahierte, das seinerseits weißer war als das aus dem alkalischen Extrakt direkt ausgefällte hellbraune und wenig wirksame Präparat.

Auch in einer Lösung des Roh-Emulsins ruft Säure einen Niederschlag hervor, der sich in Überschuß der Säure löst. Um die für die Fällung optimale Acidität kennenzulernen, wurde eine Roh-Enzymlösung bereitet und in Mengen von 100 ccm mit wechselnden Mengen Essigsäure versetzt, wonach die Niederschläge abfiltriert wurden. In den Filtraten wurde die Acidität elektrometrisch gemessen und das Trockengewicht bestimmt. Dann wurde in je 5 ccm die enzymatische Wirkung gemessen, durch Beobachtung der maximalen Rechtsdrehung in einer Reaktionsmischung von 2 ccm Aldehyd + Cyanwasserstoff[1]) + Puffer + Enzym = 30,6 ccm. Aus den spezifischen Drehungen wurden die Reinheitsgrade der verschiedenen Enzymlösungen berechnet (Tabelle III und Abb. 1).

Tabelle III.

Acidität p_H	Trockengewicht Proz.	Maximale Drehung	Spezifische Drehung	Reinheitsgrad
8,5 (keine Säure)	2,61	1,30°	8,0°	61
7,4	2,53	1,30	8,0	63
5,4	2,20	1,30	8,0	73
5,1	0.98	1,25	7,7	157
5,0	0,70	1,30	8,0	228
4,8	0,63	1,30	7,7	253
4,6	0,65	1,25	8,0	236
4,2	1,45	0,90	5,5	76
3,9	2,60	0,60	3,7	28

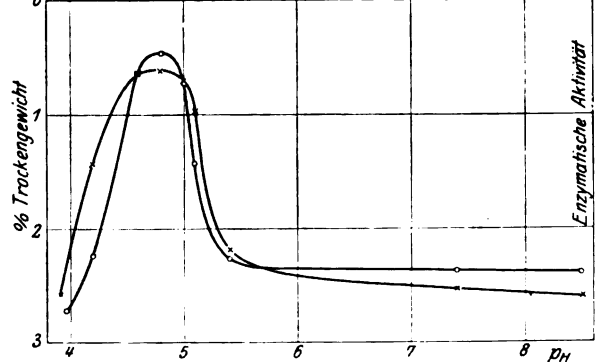


Abb. 1. Trockengewicht (×) und enzymatische Aktivität (o) bei verschiedenen Aciditäten. Die Aktivität ist als Reinheitsgrad willkürlich aufwärts abgesetzt.

[1]) Bei allen Versuchen war, wenn nicht anders gesagt wird, die Cyanwasserstoffmenge dem Aldehyd äquivalent.

Bei steigender Acidität wird also immer mehr Eiweiß gefällt, bis bei $p_H = 4{,}8$ das Maximum erreicht wird. Setzt man mehr Säure hinzu, löst sich der Niederschlag wieder, (als Acidalbumin) bei $p_H = 3{,}9$ vollständig. Obgleich das Trockengewicht von 2,6 bis 0,6 Proz. abnimmt, wird kein Enzym gefällt. Durch eine Fällung mit Säure bis $p_H = 4{,}8$ kann also die enzymatische Kraft des Präparats vervierfacht werden.

3. Adsorption durch Tonerde.

Das Aluminiumhydroxyd wurde folgendermaßen hergestellt. Ein Kilogramm $Al_2(SO_4)_3 + 18\,H_2O$ wurde in 3 Litern kochenden Wassers gelöst und die Lösung in 3 Liter heißen 20proz. NH_3 eingegossen. Die Mischung wurde 10 Stunden gekocht und der Niederschlag dann so lange durch Dekantation mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser mit *Nesslers* Reagens keine Färbung gab. Das Tonerdehydrat wurde in 5proz. Suspension aufbewahrt. Die schleimige Mischung hatte eine Acidität $p_H = 6{,}8$ (elektrometrisch gemessen).

A. Tonerdehydrat sorbiert. Phosphat und Arsenat eluieren.

Von einer dialysierten Enzymlösung (Trockengewicht 0,60 Proz., Aschengehalt 0,01 Proz., $p_H =$ etwa 6) wurden 250 ccm mit 50 ccm Al-Suspension verrührt. Nach 30 Minuten wurde das Tonerdehydrat abfiltriert, mit ein wenig destilliertem Wasser gewaschen und dann mit einer 1proz. Lösung von KH_2AsO_4, die mit NH_3 gegen Phenolphthalein neutral gemacht war, geschüttelt. Nach Filtration wurde die Elution dialysiert. Das Trockengewicht war dann 0,13 Proz. und der Aschengehalt 0,03 Proz. In 15 ccm dieser Lösung und in 2,5 ccm der ursprünglichen Lösung + 12,5 ccm Wasser wurde die enzymatische Wirkung gemessen (2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 37 ccm). Die Mengen der Lösungen waren so gewählt, daß sie gleichen Mengen fester Substanz entsprachen. Im ersten Falle wurde die Drehung $1{,}35^0$, im zweiten Falle $0{,}22^0$ beobachtet (die Acidität war in beiden Fällen $p_H = 5$). Die spezifischen Drehungen berechnen sich hieraus zu 1,6 bzw. $10{,}0^0$, wobei man findet, daß der Reinheitsgrad der ursprünglichen Lösung 109 und der der gereinigten Lösung 667 ist. Der Reinheitsgrad der dialysierten Elution ist also sechsmal größer als der der Ausgangslösung (die Drehungen sind so klein, daß sie den Enzymmengen proportional sind).

Das Arsenat kann durch *Phosphat* ersetzt werden.

B. Menge sorbierter Substanz.

Von einer dialysierten, neutralen 1,64proz. Roh-Emulsinlösung wurden drei Proben von 100 ccm mit verschiedenen Mengen Al-Suspen-

sion versetzt. Nach einer Stunde wurde filtriert und in den Filtraten das Trockengewicht und die enzymatische Kraft bestimmt (2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 25 ccm). In den zwei letzten Proben (siehe Tabelle IV) war das Enzym vollständig sorbiert worden. Die Sorbate wurden mit je 50 ccm 1 proz. Arsenatlösung eluiert ($p_H = 6{,}2$). Nach dreitägiger Dialyse wurden in 10 ccm die enzymatische Wirkung und das Trockengewicht bestimmt.

Tabelle IV.

Al-Hydroxyd g	Nicht sorbierte Substanz g	Trockengewicht der dialys. Elution Proz.	Drehung durch 10 ccm Elution
0	1,64	—	—
0,5	0,86	0,04	0,22°
1,5	0,23	0,03	0,20
2,5	0,05	0,05	0,10

Von 0,5 g Al-Hydroxyd ist also etwa die Hälfte der Trockensubstanz sorbiert worden, von 1,5 g beinahe alles. Dabei ist die Sorption des Enzyms vollständig. Da hier wie gewöhnlich der Reinheitsgrad beträchtlich erhöht worden ist (mit 1,5 g bis 330), müssen wir schließen, daß die *Elution*, nicht aber die Sorption, recht selektiv sein muß.

(Besondere Versuche zeigten, daß eine Menge der Roh-Enzymlösung, die in Trockengewicht 10 ccm der Elution entsprach, keine merkbare Drehung hervorrufen konnte, und daß also eine große Verbesserung des Reinheitsgrades erzielt worden war.)

C. Abhängigkeit der Sorption von der Acidität.

Eine Roh-Emulsinlösung mit dem Trockengewicht 2,27 Proz. wurde mit Essigsäure gefällt. Vom Filtrat (Trockengewicht 0,55 Proz.) wurden Proben genommen, die mit Salzsäure, Essigsäure oder Natronlauge zu verschiedenen Aciditäten gebracht wurden (elektrometrische Messung). Nun wurden 50 ccm von jeder Probe mit je 5 ccm Al-Suspension versetzt und 30 Minuten geschüttelt, wonach p_H noch einmal bestimmt wurde. Die Elution wurde mit 10 ccm molarer Na_2HPO_4 + 15 ccm Wasser während einer halben Stunde vorgenommen. Nachdem die Filtrate 15 Stunden dialysiert waren, wurde die Acidität wieder bestimmt und die Maximaldrehung im Substratgemisch (10 ccm Enzymlösung + 2 ccm Aldehyd + 16,3 ccm 1,19 n HCN-Lösung + 5 ccm Acetatpuffer, $p_H = 5{,}2$) beobachtet. Das Trockengewicht der dialysierten Elutionen war im Durchschnitt 0,04 Proz.

Tabelle V.

p_H vor der Sorption	p_H nach der Sorption	p_H nach der Dialyse	Maximale Drehung	p_H vor der Sorption	p_H nach der Sorption	p_H nach der Dialyse	Maximale Drehung
0,35	0,66	6,10	0,00°	5,16	5,47	6,88	1,70°
1,91	2,81	6,30	0,85	5,79	6,20	6,95	1,75
3,39	3,63	6,28	1,30	9,06	7,00	6,98	1,75
3,51	3,71	6,27	1,35	11,31	8,25	7,02	1,45
4,19	4,30	6,30	1,55	12,70	12,60	7,12	0,15
4,69	4,95	6,77	1,65	13,17	13,15	7,59	0,00

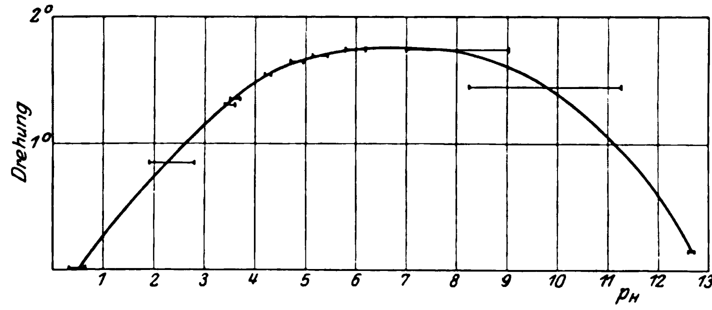


Abb. 2. Sorptions-p_H-Kurve.

Obgleich ohne Schädigung des Enzyms die Sorption zwischen $p_H = 3$ und 10 vorgenommen werden kann, ist es aus Tabelle V und aus Abb. 2 ersichtlich, daß man die größte Sorption bei $p_H = 6$ bis 7 erzielt.

Wenn man wie hier zuerst das mit Säure fällbare Eiweiß beseitigt und danach die Lösung durch Sorption reinigt, wird sie so eiweißfrei, daß kein Niederschlag bei Zufügung des Substrats entsteht. Bei Verwendung eines so gereinigten Enzyms kann also die Ausbildung der Rechtsdrehung stetig beobachtet werden.

D. Elution bei verschiedener Acidität.

Nachdem durch Vorproben gefunden worden war, daß alkalisches Arsenat weit mehr Enzym eluiert als saures, wurde die Acidität der maximalen Elution herausgesucht. Die Elutionsflüssigkeit war $^2/_3$ molares Phosphat, das durch NaOH auf verschiedene Aciditäten gebracht wurde, die elektrometrisch bestimmt wurden.

Eine Roh-Emulsinlösung wurde dialysiert, wonach das Trockengewicht 2,27 Proz. gefunden wurde. Von dieser Lösung wurden 600 ccm mit 130 ccm Tonerde-Aufschlämmung versetzt, und nach 24 Stunden wurde das Sorbat abfiltriert, wonach das Trockengewicht des Filtrats 0,40 Proz. und der Aschengehalt 0,01 Proz. war. Das Sorbat wurde in 100 ccm Wasser aufgeschlämmt. Davon wurden je 15 ccm mit 2 ccm

Phosphatlösung bestimmter Acidität gemischt. Nach 17 Stunden wurden die Elutionen filtriert, 5 ccm der Filtrate mit dem Substrat gemischt und die Maximaldrehung beobachtet (2 ccm Aldehyd, 5 ccm Acetatpuffer mit $p_H = 5{,}2$ in der Mischung) Totalvolumen 25 ccm.

Tabelle VI.

Acidität bei der Elution . .	5,0	5,8	6,4	6,8	7,2	7,7	8,6	11,3
Maximaldrehung	0,30	0,50	1,05	1,60	1,85	2,00	2,10	2,10°

Wie aus der Tabelle VI hervorgeht, wird also durch alkalische Elution weit mehr Enzym freigemacht als durch saure.

Mit einer anderen Roh-Emulsinlösung wurde ein ähnlicher Versuch angestellt, wobei die Acidität der Phosphatmischung in noch weiteren Grenzen variiert wurde. Die Elutionen wurden vor der Prüfung dialysiert. Es ergab sich, daß bei $p_H = 0{,}88$ kein Enzym eluiert wurde, daß bei $p_H = 4{,}8$ ein wenig Enzym frei gemacht war und daß die ausgelöste Enzymmenge danach mit fallender Acidität stetig zunahm, um bei kräftiger Alkalinität ($p_H = 13$) wieder klein zu werden, was allerdings auf Enzymzerstörung beruhen kann.

Auch durch *Elution mit Alkali ohne Phosphat* ($p_H = 10{,}3$) wurde eine wirksame Lösung erhalten, die indessen nach Dialyse eine nur halb so große Drehung gab als die mit Phosphat von derselben Acidität gewonnene Lösung. Wasser ohne Alkali löste kein Enzym aus. Anscheinend ist also die Acidität ausschlaggebend und das Phosphat scheint dadurch beizutragen, daß es unlösliches Al-Phosphat liefert, wobei das Enzym verdrängt wird. In den folgenden Versuchen wurde mit 0,5 molarer Phophatlösung eluiert ($p_H = 9 - 10$)[1].

E. Sorption durch Ferrihydroxyd.

Das Ferrihydroxyd wurde in derselben Weise wie das Tonerdehydrat hergestellt, indem Ferrisulfat heiß mit starkem NH_3 gefällt wurde. Die Aufschlämmung des ausgewaschenen Hydroxyds hatte ein Trockengewicht von 5,5 Proz.

200 ccm einer säuregereinigten 0,82 proz. Enzymlösung wurden mit 50 ccm der $Fe(OH)_3$-Aufschlämmung geschüttelt. Nach einer Stunde wurde filtriert und mit 25 ccm Phosphatlösung + 25 ccm Wasser eluiert ($p_H = 8{,}5$). Das Filtrat von der Sorption mit dem etwa nicht sorbierten Enzym hatte das Trockengewicht 0,47 Proz. und $p_H = 6{,}3$. Es wurde gefunden, daß die Lösung keine enzymatische Wirkung zeigte. Die Elution wurde dialysiert, wobei etwas Ferrihydroxyd aus-

[1]) Wie aus den neueren Untersuchungen (besonders von *Willstätter*) hervorgeht, können aus Sorptionsversuchen an unvollständig gereinigten Enzymen keine Schlüsse über ihre elektrochemische Natur gezogen werden.

flockte. Nach Filtrieren zeigte die dialysierte Lösung das Trockengewicht 0,29 Proz. und $p_H = 6,8$. Die enzymatische Wirkung wurde nun in je 5 ccm der ursprünglichen Lösung und der Elution bestimmt. Die Drehungen 0,95 und 0,60^0 wurden beobachtet (2 ccm Aldehyd in 25 ccm). Die Elution gibt eine ziemlich schlechte Ausbeute, aber trotzdem ist die eluierte Lösung bedeutend reiner als die Ausgangslösung (in diesem Falle sind die Reinheitsgrade 120 bzw. 214). Eine Reinigung kann also sowohl mit Fe als mit Al ausgeführt werden.

Es wurden nun zwei vergleichende Sorptionsversuche mit gleichen Mengen $Al(OH)_3$ und $Fe(OH)_3$-Aufschlämmung ausgeführt. Von den Elutionen wurden in Trockengewicht gleiche Mengen auf Enzym geprüft, wobei es sich herausstellte, daß die Drehungen sich wie 1:0,85 verhielten. Es scheint also, als wäre das Tonerdehydrat ein wenig überlegen.

Bei einem Versuch, mit einer zweiten Sorption die Elution weiter zu reinigen, wurde keine deutliche Verbesserung wahrgenommen.

F. Versuche zur Sorption mit Kaolin.

Es wurde von einer schon mit Al gereinigten Enzymlösung ausgegangen, und Sorptionsversuche sowohl in saurer als in alkalischer Lösung wurden gemacht. In den Phosphatelutionen fand ich indessen kein Enzym. In einem anderen Versuch wurden die Sorbate direkt geprüft, enthielten aber kein Enzym.

G. Reinigung mit Bleiacetat und Schwefelwasserstoff.

Eine säuregereinigte Emulsinlösung (Trockengewicht 0,97 Proz., Asche 0,11 Proz., $p_H = 6,53$) wurde mit einer kleinen Menge gesättigter Lösung von basischem Bleiacetat versetzt. Ein reichlicher Niederschlag, der sich bei weiterem Zusatz von Bleisalz nicht vermehrte, wurde abfiltriert, mit ein wenig Wasser gewaschen, dann mit Wasser verrieben und mit einem kräftigen Strom von H_2S behandelt. Wenn alles Blei als Sulfid gefällt war, wurde filtriert. (Wenn das Schwefelblei sich in kolloider Form löste, wurde es leicht mit ein wenig Natriumacetat ausgeflockt). Das Filtrat war farblos und klar, Trockengewicht 0,75 Proz., Asche 0,27 Proz. Von der organischen Substanz war also etwa die Hälfte gefällt worden. In je 1 ccm der ursprünglichen und der gereinigten Lösung wurde die enzymatische Wirkung festgestellt (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Die Drehungen waren 1,10 und 1,35^0, die Reinheitsgrade 660 und 1450 entsprechend. Der Reinheitsgrad ist also mehr als verdoppelt.

In einem zweiten Versuch mit derselben Ausgangslösung enthielt das H_2S-Filtrat 1,16 Proz. feste Stoffe und 0,51 Proz. Asche, d. h. 0,65 Proz. organische Substanz. Ein Teil wurde dialysiert, wodurch

das Trockengewicht zu 0,18 Proz. und der Aschengehalt zu 0,01 Proz. sank. Diese Lösung gab die Drehung 1,20°, einer Aktivität von 3640 entsprechend. Durch die Reinigung wurde also der Reinheitsgrad 5,5mal größer als der der ursprünglichen Lösung.

Wiederholte Reinigung. Ein Teil von einer schon durch diese Methode gereinigten Enzymlösung mit Trockengehalt 0,30 Proz. und Asche 0,02 Proz. wurde wieder mit Pb gefällt, mit H_2S eluiert und dann dialysiert, wonach ein Gehalt von 0,08 Proz. Trockensubstanz und 0,00 Proz. Asche gefunden wurde. Die Aktivität der ersten und der zweiten Lösung wurde geprüft, wobei gefunden wurde, daß 1 ccm der beiden Lösungen in den Reaktionsmischungen (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm) die Drehungen 2,00 und 1,55° hervorrief. Dies gibt einen Reinheitsgrad von 3680 bzw. **10000**. Durch einmal wiederholte Behandlung mit Pb und H_2S, in Verbindung mit Dialyse, läßt sich also die Roh-Enzymlösung weitgehend reinigen. Von den hier geprüften Methoden scheint diese die beste zu sein, und ein rund *hundertfacher Reinheitsgrad* im Vergleich mit dem Rohpräparate kann leicht erreicht werden.

Setzt man direkt zu dem Substrat den enzymhaltigen Bleiniederschlag, wird eine kräftige Rechtsdrehung beobachtet. Das Bleisulfid und das Dialysat sind dagegen vollkommen inaktiv.

Statt des basischen Bleiacetats kann auch *neutrales* mit etwa demselben Erfolg angewendet werden. Die Elution des Enzyms mit H_2S wird in beiden Fällen erleichtert, wenn etwas NaOH zugefügt wird, um die durch H_2S in Freiheit gesetzte Essigsäure abzustumpfen.

III. Direkte Reinigung des Mandelextrakts.

Um zu erfahren, ob die Ausfällung des Roh-Emulsins durch Aceton etwa entbehrt werden konnte, wodurch die Reinigung weit einfacher werden sollte, wurden auch Reinigungsversuche mit *Placentextrakt* ausgeführt.

A. Dialyse.

Placent wurde mit schwach alkalischem Wasser extrahiert und das Filtrat mit ein wenig Essigsäure gefällt. Das Filtrat hatte das Trockengewicht 2,72 Proz. und den Aschengehalt 0,28 Proz. Ein Teil wurde dialysiert und dann das Trockengewicht zu 0,07 Proz. bestimmt. Beide Lösungen wurden auf Enzymgehalt geprüft (5 ccm Enzym, 2 ccm Aldehyd in Totalvolumen 25,7 ccm). Die Drehungen waren 1,45 und 1,80°, wovon sich die Reinheitsgrade 61 und 2660 berechnen. Die dialysierte Lösung war also etwa 40mal aktiver als die undialysierte. Die Außenflüssigkeit bei der Dialyse wurde bei vermindertem Druck und 30° eingeengt, gab aber keinen enzymatischen Effekt. Durch Dialyse kann also der Mandelextrakt weitgehend gereinigt werden.

B. Sorption.

Ein Extrakt, der mit Säure von dem größten Teile des Eiweißes befreit war und das Trockengewicht 1,74 Proz. hatte, wurde sowohl in saurer (p_H = 4 bis 5) als in alkalischer Lösung mit Al behandelt. Zu 300 ccm Extrakt wurden in beiden Fällen 20 ccm $Al(OH)_3$-Aufschlämmung gesetzt. Beide Adsorbate wurden mit 100 ccm Dinatriumphosphatlösung ($^2/_3$ molar) eluiert und die Elutionsflüssigkeiten dann dialysiert. In beiden Fällen wurden hellbräunliche, ein wenig opaleszente Lösungen erhalten. Die aus der sauren Flüssigkeit erhaltene Lösung hatte das Trockengewicht 0,78 Proz., die durch alkalische Sorption gewonnene 0,30 Proz. (beide gaben merkbare Niederschläge beim Vermischen mit dem Substrat und waren also ziemlich unrein). In 1 ccm wurden die Enzymmengen bestimmt (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Aus den Drehungen 0,20 bzw. 0,65° berechnen sich die Reinheitsgrade 130 bzw. 1120. Die aus dem basischen Extrakt erhaltene Lösung ist also etwa 9mal aktiver als die aus dem sauren gewonnene.

Um zu untersuchen, ob ein durch *Dialyse* gereinigter Extrakt durch Al-Sorption weiter verbessert werden kann, wurde ein solcher Extrakt von Trockengewicht 0,62 Proz. mit Al sorbiert und mit Phosphat eluiert. Nach Dialyse hatte die Lösung das Trockengewicht 0,50 Proz. Je 5 ccm des Extrakts und der Elution gaben die Drehungen 0,80 und 1,75° (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm), entsprechend den Reinheitsgraden 133 und 361. Durch die Sorption ist also der Reinheitsgrad etwa verdreifacht worden.

Schließlich wurde ein mit *Säure und Dialyse* gereinigter Extrakt sorbiert. Eine Lösung mit dem Trockengewicht 4,06 Proz. wurde mit Essigsäure gefällt und das Filtrat dialysiert. Das Trockengewicht wurde dadurch 0,52 Proz. Durch Sorption, Elution und Dialyse erhielt ich eine Lösung mit dem Trockengewicht 0,66 Proz. Je 5 ccm der Lösungen wurden auf Enzymgehalt geprüft (2 ccm Aldehyd in 25,7 ccm). Die ursprüngliche Lösung gab 2,95°, die säuregereinigte 1,45° und die Elution 2,90°, wovon sich die Reinheitsgrade 75, 287 und 457 berechnen. Nach der Säurebehandlung war also der Reinheitsgrad viermal und nach der Sorption sechsmal größer als im Rohextrakt.

C. Reinigung mit Bleiacetat.

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß auch bei der Fällung mit $PbAc_2$ ein neutraler oder schwach basischer Extrakt eine bessere Ausbeute lieferte als ein saurer Extrakt, wurde ein alkalischer Extrakt aus Mandelpulver bereitet und dialysiert. Das Trockengewicht war dann 2,07 Proz. und der Aschengehalt 0,02 Proz. Ein Teil dieser Lösung wurde mit neutralem Bleiacetat vollständig gefällt. Nach Behandlung mit H_2S, Filtration und Dialyse wurde aus dem Bleiniederschlag eine

Lösung erhalten, die nach Einengen das Trockengewicht 1,34 Proz. und den Aschengehalt 0,02 Proz. aufwies. Von beiden Lösungen wurde 1 ccm auf Enzym geprüft (2 ccm Aldehyd in 23,1 ccm). Aus den beobachteten Drehungen 0,80 und 3,70^0 berechnen sich die Reinheitsgrade 180 und 1300. Der Reinheitsgrad ist im letzten Falle etwa 7 mal größer. Die Methode ist also auch bei Mandelextrakt gut.

D. Reinigungsversuche mit Tannin.

In einer Lösung von Roh-Emulsin ruft Tannin einen Niederschlag hervor, der enzymatisch sehr aktiv ist. Ein Extrakt aus Placentpulver wurde mit Säure gereinigt, eingeengt und mit Tannin fraktioniert gefällt. Die erste Fraktion, welche die Hauptmenge ausmachte, war weniger wirksam als die letzte. Durch Behandlung mit Bleioxyd und Wasser oder mit Baryt konnte ein stark wirksames Filtrat erhalten werden. Da indessen meine Enzymlösungen, an sich linksdrehend, durch die Anwesenheit des Tannins stark rechtsdrehend wurden und dadurch die Berechnung der Drehung des gebildeten Oxynitrils erschwerten, habe ich keine weiteren Versuche mit dieser Methode ausgeführt.

Vergleich der β-Glucosidase- und der Oxynitrilesewirkung verschiedener Präparate.

Im Zusammenhang mit den Versuchen zur Reinigung der Oxynitrilese wurde auch in aller Kürze untersucht, wie sich ein anderes Enzym der Mandeln, die *β-Glucosidase*, bei den Reinigungsoperationen verhält.

Roh-Emulsin wurde in Wasser gelöst = Lösung E_1, mit Trockengewicht 3,25 Proz. und Asche 0,11 Proz. Ein Teil dieser Lösung wurde mit Säure gereinigt und dann mit Aceton gefällt. Von dem getrockneten Pulver wurde eine 3,95 proz. Lösung bereitet, Asche 0,30 Proz., = Lösung E_2. Ein Teil davon wurde mit Bleiacetat behandelt und dialysiert und gab die Lösung E_3, mit Trockengewicht 0,59 Proz. und Asche 0,01 Proz. Von den drei Lösungen wurden 0,3 ccm auf Oxynitrilese untersucht (2 ccm Aldehyd in 23,1 ccm, $p_H = 5,2$). Aus den beobachteten Drehungen E_1 0,35^0, E_2 1,30^0 und E_3 1,65^0 berechnen sich die Reinheitsgrade der Lösungen: 166, 550 und 4390. Die relativen Aktivitäten sind also 1, 3,3, und 26,4.

Nun wurde die *Salicinspaltung* der drei Lösungen bestimmt[1]. Die 2 proz., mit Puffer versetzte Salicinlösung zeigte die Drehung — 2,30^0. Die vollständige Spaltung entspricht der Drehung + 1,19^0. Zu 15 ccm dieser Lösung setzte ich 1,0 ccm E_1 oder 0,9 ccm E_2 oder 1,0 ccm E_3. Im ersten Falle wurde nach $2^1/_4$ Stunden die Drehung

[1]) *Helferich*, Zeitschr. physiol. Chem. **117**, 160, 1921.

— 0,85° gefunden (nach Zusatz von Pottasche — 0,70°). Im zweiten Falle nach derselben Zeit 0,35° bzw. 0,50, im dritten Versuch nach $^1/_4$ Stunden — 1,80°, nach $1^1/_2$ Stunden — 0,85° und nach $2^1/_4$ Stunden — 0,35° (nach Zusatz von Pottasche — 0,20°). Aus diesen Zahlen berechnen wir die Reaktionskoeffizienten zu 197, 521 und $282 \cdot 10^{-5}$. Da diese Koeffizienten den Enzymmengen proportional sind, finden wir die relativen Reinheitsgrade bezüglich der β-Glucosidase zu 1, 2,6 und 8,3. Wir finden also, daß die zwei Enzyme in sehr verschiedenem Grade angereichert werden. So ist z. B. durch die Bleimethode die Oxynitrilese dreimal reiner als die Glucosidase.

IV. Eigenschaften der Oxynitrilesepräparate.

A. Spezifische Drehung des Enzympräparats.

Eine undialysierte Roh-Emulsinlösung (6 Proz.) gab die Drehung — 4,80° (2-dm-Rohr), eine andere, 3,94proz. Lösung die Drehung — 3,20°. Die spezifischen Drehungen sind also — 40,0 bzw. — 40,6°. Nach Dialyse, wodurch das Trockengewicht auf 2,9 Proz. sank, gab die erste Lösung die spezifische Drehung — 44,8°, die zweite Lösung mit Trockengewicht 3,47 Proz. gab — 45,1°. Einige andere Roh-Emulsinlösungen (dialysiert), deren Trockengewicht zwischen 1,2 und 2,8 Proz. schwankten, zeigten die spezifischen Drehungen — 44,7, — 44,6, — 44,4, — 44,4, — 44,0, — 45,1 und — 45,8°. Das Mittel scheint — **45°** zu sein.

Die Präparate, die nach den verschiedenen oben geschilderten Methoden gereinigt waren (Trockengewicht unter 1 Proz.), zeigten spezifische Drehungen zwischen — 30 und — 40°, mit einem Mittel von etwa — **35°**.

In diesem Zusammenhang sei auf die wichtige Tatsache hingewiesen, daß die spezifische Drehung des Enzympräparats sich durch Hitzeinaktivierung des Enzyms nicht änderte. Nun hängt ja mit aller Wahrscheinlichkeit die Wirkung der Oxynitrilese mit ihrer optischen Aktivität zusammen, und es ist möglich, daß die Hitzeinaktivierung mit einer Racemisierung zusammenhängt. Da nun aktive und hitzeinaktivierte Enzymlösungen dieselben spezifischen Drehungen zeigten, würde folgen, daß das Enzym zu der Drehung der Lösung nur wenig beiträgt, sei es wegen einer sehr kleinen spezifischen Drehung oder wegen einer sehr geringen Konzentration im Präparat.

B. Stabilität bei Zimmertemperatur.

Eine toluolhaltige Enzymlösung, die durch Sorption mit Al gereinigt war (0,13 Proz.) und mit Reinheitsgrad 667, gab im Substrat-

gemisch die Drehung 1,35°. Nach einem Monat gab dieselbe Menge der Enzymlösung die Drehung 1,30°. Das Enzym wird also beim Aufbewahren unter Toluol bei Zimmertemperatur während dieser Zeit nicht merkbar inaktiviert.

Um die Stabilität gegen Säure zu prüfen, versetzte ich eine dialysierte Roh-Emulsinlösung vom Reinheitsgrad 65 mit wachsenden Mengen Essigsäure. Jedesmal wurde der Eiweißniederschlag abfiltriert und im Filtrat die Acidität, das Trockengewicht und, nach Neutralisieren, die enzymatische Wirkung bestimmt. Durch die Säurefällung nahm das Trockengewicht von 1,45 bis 0,15 Proz. ab (Reinheitsgrad 663), ohne daß die Drehung des Reaktionsgemisches (1,90°) im meßbaren Grade vermindert wurde. Auch in den Lösungen, die mit Essigsäure noch saurer gemacht waren ($p_H = 3$), wurde nach Neutralisieren eine ebenso gute Wirkung beobachtet. Die Einwirkungsdauer der Säure war 1 Stunde. Diese Acidität zerstört also das Enzym nicht.

Auch in alkalischer Lösung ist es sehr haltbar. So gab z. B. eine Enzymlösung, die nach Sorption mit Al bei $p_H = 11,3$ eluiert wurde (1 Stunde), eine ebenso große Drehung wie eine durch Elution bei $p_H = 7$ bis 8 erhaltene Lösung. Bei einem anderen Versuch wurden die zwei Elutionen bei $p_H = 8,5$ und 12,5 während 12 Stunden vorgenommen. Nach Dialyse waren die Trockengewichte 0,21 und 0,20 Proz. und die Aciditäten $p_H = 8,1$ und 8,9. Im Substratgemisch (2 ccm Aldehyd in 30,6 ccm) wurden die Drehungen 0,85 bzw. 0,30°, den Reinheitsgraden 495 und 180 entsprechend, erhalten. Während 12 Stunden verliert also das Enzym bei $p_H = 12,5$ etwa zwei Drittel seiner Wirksamkeit. (Hier ist allerdings zu bemerken, daß die Acidität $p_H = 12,5$ wahrscheinlich mit der Zeit ein wenig zunahm. Die Base wird nämlich allmählich teilweise an das feste Al-Hydroxyd gebunden.)

C. Thermostabilität. Inaktivierungstemperatur (1 Stunde).

Es wurde zuerst das p_H-Stabilitätsoptimum des Enzyms bestimmt. Eine säuregereinigte Enzymlösung (Reinheitsgrad 503, Trockengewicht 4,06 Proz., Asche 0,46 Proz., spezifische Drehung — 41,7°, $p_H = 6,3$) wurde in mehrere Proben geteilt, die mit ihrem doppelten Volumen verschiedener Acetatpuffer versetzt und dann im Thermostaten während einer Stunde zu 60, 70 oder 80° erhitzt wurden. Nach Abfiltrieren des etwa gebildeten Niederschlags wurden die Drehungen bestimmt und die Lösungen dann 24 Stunden dialysiert. Von der Lösung wurden je 10 ccm mit dem Substrat (2 ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN, 1,45 n, + 5 ccm Acetatpuffer, $p_H = 5,3$ in der Reaktionsmischung) vermischt und die Maximaldrehungen beobachtet.

Tabelle VII.

Temperatur	Puffer (m/Liter)	Eigendrehung	Drehung im Substrat
60°	1 ccm Essigsäure + 9 ccm Acetat	— 0,75°	2,40°
	0,5 „ „ + 9,5 „ „	— 0,85	2,30
	0 „ „ + 10 „ „	— 0,85	(2,00)
	0,2 „ NaOH + 9,8 „ „	— 0,85	2,30
70°	4 „ Essigsäure + 6 „ „	— 0,50	0,25
	2 „ „ + 8 „ „	— 0,70	0,55
	0,5 „ „ + 9,5 „ „	— 0,85	1,75
	1 „ NaOH + 9 „ „	— 0,50	0,00
80°	1 „ Essigsäure + 9 „ „	— 0,75	0,00
	0,5 „ „ + 9,5 „ „	— 0,80	0,00
	0 „ „ + 10 „ „	— 0,85	(0,05)
	0,2 „ NaOH + 9,8 „ „	— 0,80	0,00

Das Stabilitätsmaximum liegt also bei der Acidität einer Natriumacetatlösung, die mit 2 bis 3 Proz. Essigsäure versetzt ist. Bei den folgenden Versuchen wurde der Puffer: 9,7 ccm Acetat + 0,3 ccm Essigsäure gebraucht ($p_H = 5,7$). Zu dieser Puffermenge wurden 20 ccm der Enzymlösung gesetzt und Proben davon während verschiedener Zeiten zu 70 oder 75° erhitzt. Die Proben wurden dann schnell gekühlt, filtriert und 5 ccm davon zu dem Substratgemische (2 ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN + 5 ccm Puffer mit $p_H = 5,3$ im Gemisch) gesetzt. Alle Proben zeigten dieselbe Eigendrehung (— 1,60°), obgleich ihre enzymatische Wirkung sehr verschieden war.

Tabelle VIII.

Temperatur	Erhitzungszeit Stunden	Drehung im Substrat	k_c	Temperatur	Erhitzungszeit Stunden	Drehung im Substrat	k_c
70°	0	3,10°	—	75°	0	3,00°	—
	1	3,00	—		1	1,65	0,26
	.2	2,80	0,023		2	1,05	0,23
	3	2,60	0,026		3	0,65	0,22
	4	2,35	0,030		4	0,35	0,23
	5	2,10	0,037		5	0,20	0,24
	6	1,35	0,033		6	0,10	0,24

Die Inaktivierungstemperatur, d. h. die Temperatur, wo das Enzym in Lösung nach einstündiger Erhitzung seine halbe Aktivität verliert, liegt also ein wenig höher als 75°.

Durch Berechnung der Reaktionskoeffizienten aus den obigen Zahlen habe ich untersucht, inwieweit sich die Hitzeinaktivierung der monomolekularen Formel: $k_c = \frac{1}{t} \log \frac{k_0}{k_t}$, in diesem Falle

$$k_c = \frac{1}{t} \log \frac{\text{Drehung nach der Erhitzungszeit } 0}{\text{Drehung nach der Erhitzungszeit } t}$$

anschließt. Die nach dieser Formel gefundenen k_c-Werte findet man im letzten Stabe der Tabelle VIII. Die Koeffizienten zeigen eine gute Konstanz.

D. *Stickstoffgehalt.*

In einer Enzymlösung, die zweimal mit Bleiacetat und Schwefelwasserstoff gereinigt war und dadurch einen Reinheitsgrad von 10000 (46mal größer als der der ursprünglichen Lösung) erreicht hatte, wurde der Stickstoffgehalt zu 12,3 Proz. bestimmt (Mikro-Kjeldahl, 5,60 mg Substrat:0,690 mg N). Da ich früher[1]) in einem nicht besonders gereinigten Präparat den Stickstoffgehalt 12,5 Proz. gefunden habe, scheint es, als sollte durch diese weitgehende Reinigung der Stickstoffgehalt nicht erheblich geändert werden.

Das *gereinigte* Präparat gab indessen keine Ninhydrinreaktion und hatte also keinen nennenswerten Eiweißgehalt. Auch koagulierte seine 0,4proz. Lösung beim Kochen nicht. Mit dem sehr empfindlichen *Molisch*schen Reagenz wurde nur eine sehr unbedeutende Kohlenhydratfärbung erhalten. Phosphorwolframsäure erzeugte einen starken Niederschlag, was möglicherweise auf die Anwesenheit alkaloidähnlicher Stoffe deuten kann. Eine Lösung von Roh-Emulsin gibt dagegen beim Kochen starken Eiweißniederschlag und auch eine sehr starke Molischreaktion.

Eine mit Tonerde-Hydrat und Elution hergestellte Lösung (0,24 Proz., Reinheitsgrad 5290 = 14mal kräftiger als die ursprüngliche) wurde mit Aceton gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Es zeigte sich indessen, daß noch viel Eiweiß beigemengt war. Auch in dieser Hinsicht ist also die Bleiacetatmethode überlegen.

Daß das Enzym mit dem Eiweiß der Lösung nichts zu tun hat, folgt übrigens sowohl aus dem Molekulargewicht (s. unten) als aus dem Umstande, daß beim Vermischen mit dem Substrat, das Eiweiß von dem Alkohol und Benzaldehyd gefällt wird, das Enzym aber in Lösung bleibt. Der Eiweißniederschlag, der immer bei Verwendung unreiner Enzymlösungen entsteht, kann beim Beginn der Reaktion abfiltriert werden, ohne daß die Rechtsdrehung vermindert oder die Reaktion in irgend anderer Weise geändert wird.

E. *Molekulargewicht nach Diffusionsversuchen.*

Da es aus vielen Versuchen deutlich war, daß das Enzym kein genuiner Eiweißstoff war, sondern wahrscheinlich ein kleineres Molekulargewicht besaß, wurden Molekulargewichtsbestimmungen mit der

[1]) Diese Zeitschr. **118**, 21, 1921.

Diffusionsmethode von *Euler*[1]) ausgeführt[2]). Angewandt wurden *Öholms* Apparate. Sperrflüssigkeit war in sämtlichen Versuchen Chloroform, $h/2 = 0{,}509$ cm.

1. Eine Lösung, die durch zweimalige Reinigung mit Bleiacetat und Dialyse den Reinheitsgrad 6200 (28mal die ursprüngliche) erreicht hatte, diffundierte während 143 Stunden bei 14°. Von jeder Schicht wurden dann 2 ccm genommen. Die Maximaldrehungen (2 ccm Aldehyd + 13,7 ccm HCN + 4 ccm Wasser + 5 ccm Puffer von $p_H = 5{,}3$ in Mischung) durch die verschiedenen Schichten wurden 2,50, 1,17, 0,24 und 0,02°. Daraus berechne ich das Molekulargewicht zu 5100.

2. Eine Lösung von Emulsin, Reinheitsgrad 166, Zeit 117 Stunden bei 15°. Die Drehungen waren 1,9, 5,0, 90,0, 20,0, 0,00°. Molekulargewicht 3700. In einem zweiten Versuch wurden die Reaktionsgemische bei 0° (anstatt 18°) gehalten. Die Drehungen 2,4, 0,1, 20,0, 25,0, 0,00°. Molekulargewicht 3100.

3. Von der soeben benutzten Emulsinlösung wurde ein Teil mit Essigsäure, Bleiacetat und Dialyse gereinigt, wodurch ihr Reinheitsgrad 4390, d. h. etwa 26mal vergrößert wurde. Diffusionszeit 42 Stunden bei 15°. Drehungen 1,60, 0,80, 0,20, 0,05. Molekulargewicht 4300.

4. Säuregereinigte Emulsinlösung. Reinheitsgrad 550. 144 Stunden bei 15°. Drehungen 2,50, 1,10, 0,20, 0,00°. Molekulargewicht 7100. In einem zweiten Versuch war die Diffusionszeit 142 Stunden bei 15°. Drehungen 2,60, 1,15, 0,22, 0,05. Molekulargewicht 6900.

5. Dialysierte Emulsinlösung, Reinheitsgrad 1350. Zeit 72 Stunden, 15°. Drehungen 1,25, 0,45, 0,03, 0,00°. Molekulargewicht 4700.

Aus 1. bis 5. berechnen sich die Diffussionskoeffizienten $D_{20} = 0{,}098$, 0,114, 0,127, 0,107, 0,083, 0,084 und 0,102 bez.

Als Mittel geben meine Molekulargewichtsbestimmungen den Wert $M = $ **5000**. Da das diffundierende Enzym von gewissen Verunreinigungen gebunden sein kann, dürfte der gefundene Wert ein oberer Grenzwert sein. Es scheint indessen aus diesen vorläufigen Bestimmungen hervorzugehen, daß das Enzym einen bedeutend höheren Dispersitätsgrad (geringere Teilchengröße) besitzt als die nativen Eiweißstoffe.

F. Enzympräparat und Silbernitrat.

Unreine Enzympräparate, wovon sehr große Mengen nötig sind, damit man eine nennenswerte Rechtsdrehung bekommt, verbrauchen meßbare Mengen $AgNO_3$. Dies muß bei der Titration des

[1]) *Euler*, Wied. Ann. **63**, 273, 1897.

[2]) Betreffend die Methodik siehe *Euler, Hedelius* und *Svanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 190, 1920.

freien Cyanwasserstoffs berücksichtigt werden. Auch mit gereinigten Enzympräparaten habe ich darüber Versuche angestellt: Zwei gleich große Mengen Cyanwasserstofflösung (18,7 ccm) wurden mit Wasser bzw. einer Enzymlösung, die mit Bleiacetat gereinigt war (dialysiert, Reinheitsgrad 725), verdünnt. Es wurden 2 ccm der Enzymlösung (Trockengewicht 3,05 Proz.) bzw. Wasser zugesetzt. Die ziemlich eiweißfreie Lösung reduzierte *Fehlings* Lösung nicht. Von den zwei HCN-Lösungen wurde die gleiche Menge $AgNO_3$ verbraucht (von 0,9 ccm, 7,5 ccm n/10 $AgNO_3$, 100 Proz. HCN entsprechend). Es ist deshalb bei Verwendung reinerer Enzymlösungen eine diesbezügliche *Korrektion unnötig.*

G. Dialyse durch Kollodiummembranen.

Durch mehrere Versuche ist gezeigt worden, daß eine Dialyse durch Kollodiumschläuche ohne wesentlichen Verlust von Enzym durchgeführt werden kann. Ich habe indessen in einem besonderen Versuch festzustellen versucht, ob in der Außenflüssigkeit irgend eine Wirkung zu finden ist. Durch Fällung mit Essigsäure und Bleiacetat wurde eine Enzymlösung mit Reinheitsgrad 2310 hergestellt und bei vermindertem Druck stark eingeengt. Sie wurde dann dialysiert, die Außenflüssigkeit neutralisiert und eingeengt, wonach sie in 1-dm-Rohr die Drehung 2,25° zeigt. Von dieser Lösung wurden 3 ccm mit dem Substrat gemischt. Die Maximaldrehung (2-dm-Rohr) war dann 0,65°. Da indessen das Dialysat selbst in dieser Verdünnung 0,60° dreht, ist die Aktivität äußerst klein und die Kollodiumhäute für Oxynitrilese ganz undurchdringlich.

V. Kinetische Versuche.

A. Die Maximaldrehung ist anfangs der Enzymmenge proportional.

Zu gleichen Substratgemischen (2 ccm Aldehyd + 20 ccm Cyanwasserstofflösung + 5 ccm Puffer, $p_H = 5{,}2$ im Gemisch) wurden verschiedene Mengen einer Roh-Emulsinlösung (3,94 Proz., Reinheitsgrad 110) gesetzt. Die Maximaldrehungen wurden beobachtet.

Tabelle IX.

Enzymmenge	Maximaldrehung	Enzymmenge	Maximaldrehung
1 ccm + 7 ccm Wasser	0,60°	4 ccm + 1 ccm Wasser	2,40°
2 „ + 3 „ „	1,20	5 „ + 0 „ „	2,85
3 „ + 2 „ „	1,80		

Erst wenn die Drehung über 2,40° stieg (spezifische Drehung 15,4°), wurde keine gute Proportionalität mehr beobachtet. (Bei der Berechnung der spezifischen Drehung ist nach anderen Versuchen eine Totalsynthese von 95 Proz. angenommen worden.)

B. *Aktivitäts-p_H-Kurve.*

Die Größe der Rechtsdrehung und die Geschwindigkeit, womit sie erreicht wird, hängen in höchstem Grade von der Acidität ab. Die p_H-Kurve wurde deswegen bestimmt, wobei als Puffer molare Acetat-Essigsäuregemische benutzt wurden. Die Enzymlösung mit Reinheitsgrad 503 hatte Trockengewicht 4,06 Proz., Asche 0,46 Proz. und die Acidität $p_H = 6{,}3$. Zu dem Gemisch von Puffer und Enzym wurde so viel Alkohol gesetzt, als der gewöhnlichen Reaktionsmischung entspricht. Die Eiweißniederschläge wurden abfiltriert und die Acidität der Filtrate elektrometrisch bestimmt. Da die Pufferkonzentration so groß gewählt wurde, daß der Einfluß von Aldehyd und HCN, die neutrale Reaktion aufwiesen, auf die Acidität sehr klein war, konnte dadurch die Acidität der Versuchslösungen festgelegt werden.

Zu 2 ccm Aldehyd + 13,6 ccm HCN + 10 ccm Puffer wurden 5 ccm Enzym oder 2,5 ccm Enzym + 2,5 ccm Wasser zugesetzt und die Maximaldrehungen beobachtet.

Tabelle X.

5 ccm Enzym		2,5 ccm Enzym			
p_H	Drehung	p_H	Drehung	p_H	Drehung
4,4	0,60°	3,9	0,05°	5,3	2,25°
4,7	1,00	4,4	0,40	5,4	2,20
4,9	2,10	4,7	0,75	5,5	2,10
5,0	2,65	4,8	1,00	5,7	1,80
5,1	2,90	4,9	1,35	5,9	1,25
5,3	3,00	5,0	1,75	6,1	0,75
5,5	2,80	5,1	2,20		
5,8	2,25	5,2	2,25		

Abb. 3. Aktivitäts-p_H-Kurve.

Nach der Tabelle X und Abb. 3 liegt das p_H-Optimum bei $p_H = 5{,}2$ bis 5,4. (Die Pufferlösung, welche in dieser alkoholischen Lösung die Acidität $p_H = 5{,}2$ gibt, gibt im gleichen Volumen Wasser $p_H = 4{,}8$.

Bei diesem Punkte wird, wie früher berichtet ist, das Eiweiß der Rohpräparate am vollständigsten gefällt.)

Bei der Deutung dieser p_H-Kurve der Oxynitrilese muß eine große Reihe von Tatsachen beachtet werden. Bei den gewöhnlichen spaltenden Enzymen werden die p_H-Kurven durch die elektrochemischen Eigenschaften des Enzyms oder der Enzym-Substratverbindung erklärt. Bei der Oxynitrilese entbehren wir sogar jede klare Vorstellung von der Enzym-Substratverbindung, und bestimmend für die p_H-Kurve sind außerdem andere, parallel mit der enzymatischen Synthese verlaufende Reaktionen, wie die symmetrische Synthese und die Racemisierung des d-Oxynitrils.

Um über eine eventuelle Bindung des Katalysators an die Substrate etwas zu erfahren, wurden Versuche mit wechselnden Substratkonzentrationen ausgeführt.

C. Die Substratkonzentration.

1. Zu 5 ccm Enzymlösung + 5 ccm Puffer (p_H = 5,2 im Gemisch) + 5 ccm Alkohol + 16,3 ccm HCN (entsprechend 2 ccm Aldehyd) wurden verschiedene Mengen Aldehyd gesetzt und die Mischungen mit Alkohol auf das Volumen 35,3 ccm gebracht. Die Maximaldrehungen wurden beobachtet.

Aldehyd ccm	Drehung	Aldehyd ccm	Drehung
1	0,80°	3	1,00°
2	1,25	4	0,80

2. Zu 10 ccm Enzymlösung (anderes Präparat) + 10 ccm Puffer + 1 ccm Aldehyd wurden verschiedene Mengen HCN und Alkohol gegeben. Volumen 51 ccm.

Cyanwasserstoff ccm	Entspricht Aldehyd ccm	Drehung	Cyanwasserstoff ccm	Entspricht Aldehyd ccm	Drehung
10	1,22	0,50°	20	2,44	0,90°
16,3	2,00	0,80	30	3,66	0,95

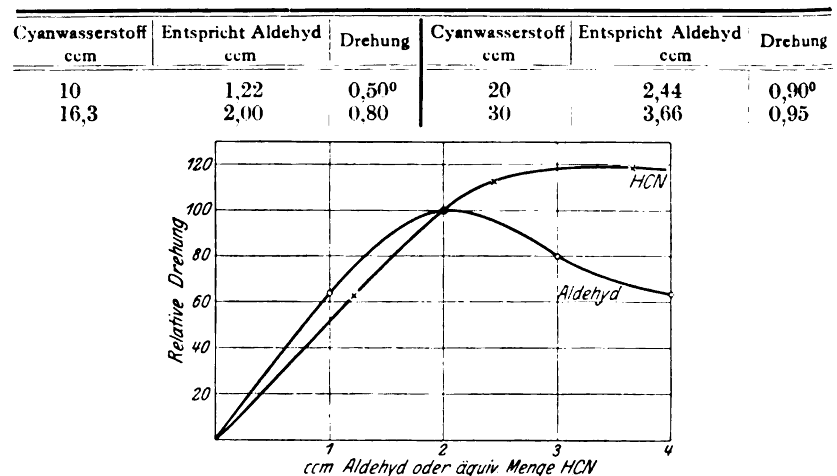


Abb. 4. Die Drehung als Funktion der Substratkonzentration.

In Abb. 4 habe ich die Drehung als Funktion der Substratkonzentration veranschaulicht. Die Drehung ist in einem willkürlichen Maßstab angegeben (die Drehungen bei äquivalenten Substratmengen sind gleich 100 gesetzt). Die eine Kurve („Aldehyd") betrifft den Versuch mit Variation der Aldehydmenge, die andere („HCN") den Versuch mit variierender HCN-Konzentration.

Wir sehen aus der Abbildung, daß mit steigender *HCN*-Konzentration die Drehung immer größer wird. Dies könnte in Analogie mit den Annahmen bei anderen enzymatischen Reaktionen so gedeutet werden, daß die Oxynitrilese mit HCN eine Verbindung eingehe, welche das rechtsdrehende Oxynitril liefert. Durch Steigerung der HCN-Konzentration muß diese Verbindung in größerer Menge gebildet werden, und daraus folgt die Mehrbildung der rechtsdrehenden Form[1]).

Daß die Drehung bei Vergrößerung der *Aldehyd*konzentration wieder abnimmt, dürfte darauf beruhen, daß HCN schneller zu symmetrischem Nitril gebunden wird und dessen Konzentration dadurch so schnell abnimmt, daß die *enzymatische* Reaktion bald zum Stehen kommt.

Unter der Annahme von einer Verbindung Enzym—HCN kann das Maximum der p_H-Kurve als das Maximum der Bildung oder der Reaktionsfähigkeit dieser Verbindung angesehen werden. Indessen dürfte, wie schon oben gesagt ist, dieses Maximum wenigstens teilweise von anderen Reaktionen bestimmt werden. So ist es z. B. klar, daß die Geschwindigkeit der Racemisierung des d-Nitrils, die in alkalischer Lösung schnell zunimmt, den alkalischen Ast der Kurve erklären kann (s. zweite Abhandlung, S. 397).

D. Hemmung durch das Reaktionsprodukt.

In Analogie mit den Verhältnissen bei anderen Enzymen war zu vermuten, daß die Geschwindigkeit der asymmetrischen Synthese durch die Anwesenheit von Oxynitril beim Versuchsbeginn herabgesetzt werden sollte, und zwar durch die Rechtsform mehr als durch die Linksform.

Mit Benzol wurde ein stark rechtsdrehendes Oxynitril isoliert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Ein Teil des Oxynitrils wurde durch Erhitzung vollständig racemisiert. Der Gehalt an Oxynitril war in beiden Fällen 95 Proz. Zu gewöhnlichen Reaktionsmischungen (2 ccm Aldehyd + 13,7 ccm HCN + 5 ccm Puffer + 1 ccm Enzym-

---

[1]) Es ist bei anderen Enzymen in gewissen Fällen möglich, eine Affinitätskonstante Enzym-Substrat zu berechnen. Es soll nur mit Vorbehalt erwähnt werden, daß, wenn man hier in gewöhnlicher Weise die Affinitätskonstante Oxynitrilese—HCN berechnet, sich der Wert etwa 4 ergibt. (Dissoziationskonstante = Molare Substratkonzentration bei halber maximaler Reaktionsgeschwindigkeit: etwa 0,23.)

lösung, das Enzym nach dem Oxynitril zugesetzt) wurde von den zwei Oxynitrilen 1,5 ccm + 1,5 ccm Alkohol zugesetzt. In einem dritten Versuch wurden nur 3 ccm Alkohol zugegeben (es wurde kontrolliert, daß die Acidität in allen drei Versuchen optimal war). Die Maximaldrehungen wurden beobachtet (die Drehung 0,10° ist wegen der Eigendrehung des d-Oxynitrils korrigiert):

Mit d-Oxynitril . . . . 0,10°
Mit racemischem Oxynitril . . . . . . 0,35°
Mit Alkohol . . . . 0,50°

Wie zu erwarten war, finden wir, daß das Enzym von dem Oxynitril gebunden wird, und zwar von der Rechtsform am kräftigsten.

E. Spezifische Drehung des d-Benzoxynitrils.

Bei kleinen Enzymmengen ist die Rechtsdrehung der Enzymmenge proportional. Vergrößert man dann die Enzymmenge, nimmt die Drehung langsamer zu, um schließlich nicht weiter mit der Enzymmenge merkbar zu steigen. Mit einer sehr großen Enzymmenge könnte man hoffen, bei optimaler Acidität ein ziemlich reines d-Oxynitril zu erhalten. (Dies wird natürlich erst dadurch ermöglicht, daß unter jenen Umständen die enzymatische Synthese viel schneller verläuft als die symmetrische. Nach meinen oben gemachten Annahmen über die Bindung des Enzyms an HCN sollte dies bedeuten, daß das „HCN-Enzym“ schneller Benzaldehyd addiert als die freie Cyanwasserstoffsäure).

1. Zu der gewöhnlichen Substratmischung wurden verschiedene Mengen einer säuregereinigten Enzymlösung zugesetzt (organische Substanz 7,20 Proz.). Die Drehungen (1-dm-Rohr) waren: mit 5 ccm Enzymlösung 2,35°, mit 7 ccm 2,50° und mit 9 ccm 2,50°. Die Totalsynthese wurde durch Bestimmung des freien HCN gemessen. Es wurde gefunden, daß in den zwei letzten Versuchen bzw. 92,3 Proz. und 92,6 Proz. des HCN gebunden war. Im letzten Falle berechne ich die spezifische Drehung 26,1°. Die Oxynitrillösungen wurden gemischt und mit dem gleichen Volumen Benzol ausgeschüttelt. Die alkoholisch-wässerige Lösung drehte dann in 2-dm-Rohr 0,15°, die benzolische Lösung 5,25°, woraus folgt, daß beinahe alles Oxynitril ausgeschüttelt war. Auch nach einer Woche war die Drehung der Benzollösung unverändert, und nach Verdunsten des Benzols bei Zimmertemperatur wurde ein stark rechtsdrehendes Oxynitril erhalten (etwa 15° in 1-dm-Rohr).

2. In einem Versuch mit derselben Substratmischung und 7 ccm einer 0,26 proz., zweimal mit Bleiacetat gereinigten Enzymlösung (Reinheitsgrad 6630) wurde die Drehung 2,70° bei 92,5 Proz. Totalsynthese beobachtet. Spezifische Drehung 28,2°.

3. Von einer gereinigten Enzymlösung (Reinheitsgrad 4000) wurden steigende Mengen zum Substratgemisch zugesetzt, wobei das Totalvolumen immer konstant gehalten wurde. Folgende Drehungen wurden abgelesen: mit 1 ccm Enzymlösung 2,75°, 2 ccm 3,10°, 3 ccm 3,10°, 4 ccm 3,15°, 5 ccm 3,20°, 6 ccm 3,15°. Die Totalsynthese wurde in sämtlichen Versuchen zu 92,0 ± 0,5 Proz. bestimmt. In den zwei letzten Fällen finden wir die spezifischen Drehungen 30,8 und 30,2°.

4. Ein mit Benzol ausgeschütteltes, stark rechtsdrehendes Oxynitril wurde auf totalen HCN-Gehalt nach *Volhard-Feldhaus* untersucht. Dabei wurde von 0,25 ccm Oxynitrillösung 9,5 ccm n/10 $AgNO_3$ verbraucht. In 1 ccm der Lösung finde ich also 0,506 g Oxynitril. In einem besonderen Versuch wurde festgestellt, daß eine Spaltung des Oxynitrils in Aldehyd und HCN in der Benzollösung nicht in Frage kommt, denn 0,8 ccm davon verbrauchten mit Alkohol gemischt nur 0,3 ccm $AgNO_3$. Das benzolhaltige Oxynitril zeigte im 1-dm-Rohr die Drehung 13,5°. Spezifische Drehung 27,3°.

5. Da die Rechtsdrehung bei Synthese bei niedriger Temperatur stärker wird, wurde schließlich die spezifische Drehung auch nach Synthese bei 0° bestimmt. (Die Wasserkonzentration mußte hier vermindert werden, da die Mischung sonst nicht homogen blieb.) Zu 2 ccm Aldehyd + 13,1 ccm HCN + 2 ccm Puffer wurden 3 ccm Enzymlösung gesetzt, und dabei wurde die Drehung 3,20° in 1-dm-Rohr, bei 95,3 Proz. Totalsynthese, beobachtet. Spezifische Drehung 25,6°. Mit 4 ccm Enzymlösung + 1 ccm Puffer wurde die Drehung 3,50° erhalten (spezifische Drehung 29,7°), und mit 5 ccm Enzymlösung + 1 ccm Puffer fand ich bei 93,8 Proz. Totalsynthese die Drehung 3,50°, was einer spezifischen Drehung von 30,0° entspricht.

Der höchste von mir erhaltene Wert, etwa 30°, ist wahrscheinlich die spezifische Drehung des reinen d-Benzoxynitrils. Dafür spricht auch, daß *Krieble* und *Wieland* [1]) gefunden haben, daß bei 0° die ganze Oxynitrilmenge in optisch aktiver Form erhalten werden kann.

F. Die Drehung des Oxynitrils in alkoholischer Lösung.

Ein mit Chloroform ausgeschütteltes d-Oxynitril zeigte nach Verdunsten des Chloroforms die Drehung 31,5° in 2-dm-Rohr, aber nach 5 Monaten nur 23°. Das Oxynitril wurde nun in Alkohol gelöst, bis die Drehung der Lösung 3,40° und also von derselben Größenordnung wie in den Enzymversuchen wurde. Wenn jetzt die Lösung mit Alkohol weiter verdünnt wurde, zeigte sich eine genaue Proportionalität zwischen Drehung und Oxynitrilgehalt. Die in meinen Versuchen

[1]) Journ. Americ. Chem. Soc. **43**, 164, 1921.

beobachteten Drehungen sind also ein direktes Maß der d-Oxynitrilmenge.

Bei sehr hohen Oxynitrilkonzentrationen nimmt indessen die Drehung beim Verdünnen schneller ab, als aus der Proportionalitätsregel zu erwarten ist. Ein mit Benzol isoliertes d-Oxynitril mit der Drehung 13,25° (1-dm-Rohr, Na-Licht) wurde so mit Alkohol verdünnt, daß zu 9 ccm Oxynitril 1 ccm Alkohol gesetzt wurde, die Drehung beobachtet, noch 1 ccm Alkohol zugesetzt usw. Die Drehungen wurden sowohl mit Na-Licht als mit Hg-Licht abgelesen [Tabelle XI und Abb. 5 (Hg-Licht)]. Mit Silbernitrat wurde gefunden, daß sogar bei der größten Verdünnung (9 ccm Oxynitril + 37 ccm Alkohol) nur 0,2 Proz. des (sauren) Oxynitrils gespalten wurden.

Tabelle XI.

Verdünnung	Drehung Hg-Licht	Drehung Na-Licht	Verdünnung	Drehung Hg-Licht	Drehung Na-Licht
9 ccm Oxynitril + 0 ccm Alkohol	15,20°	13,25°	9 ccm Oxynitril + 9 ccm Alkohol	5,70°	5,05°
+ 1	12,55	—	+ 11	5,10	4,40
+ 2	10,80	9,50	+ 13	4,50	4,00
+ 3	9,55	8,40	+ 17	3,50	3,20
+ 4	8,55	7,55	+ 21	3,10	2,75
+ 5	7,70	6,85	+ 27	2,40	2,75
+ 7	6,50	5,80	+ 37	1,90	1,70

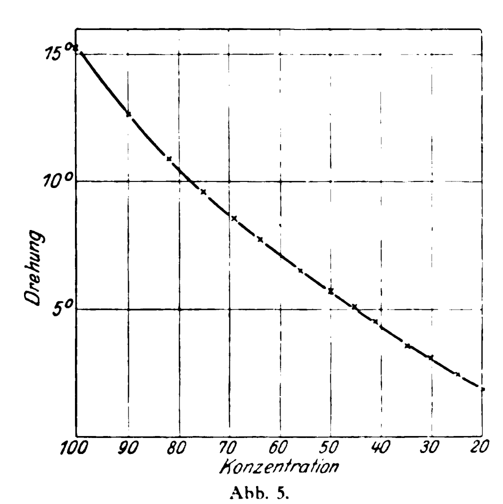


Abb. 5.
Die Drehungsabnahme bei Verdünnung des Oxynitrils.

Die früher bestimmte spezifische Drehung 30° wurde mit Na-Licht beobachtet und dürfte also im Hg-Licht etwa 32° betragen.

G. *Racemisierung des d-Oxynitrils.*

Schon früher habe ich in meiner Arbeit gefunden, daß erhöhte Temperatur einer geringeren Drehung entspricht, was auf die vergrößerte Racemisierungsgeschwindigkeit zurückzuführen ist. Ich habe nun einige weitere Versuche angestellt, indem ich bei verschiedenen Temperaturen sowohl die Drehung

als die Totalsynthese bestimmte. Zu 4 ccm Aldehyd + 26,2 ccm HCN-Lösung + 10 ccm Puffer (p_H in der Mischung = 5,2) wurden 5 ccm einer Enzymlösung (aus Mandelextrakt mit Säure, Bleiacetat und Dialyse hergestellt, Reinheitsgrad 4320) zugesetzt. Proben von 3 ccm zur Silbertitration (Tabelle XII).

Aus der Tabelle XII sehen wir, daß bei höherer Temperatur die Maximaldrehung kleiner ist und schneller abnimmt. Bei 60° wird keine Rechtsdrehung beobachtet. Bei dieser Temperatur bleibt auch die Totalsynthese bei einem niedrigeren Werte stehen. Um festzustellen, daß diese Verschiebung der Gleichgewichtslage von der Anwesenheit des Enzyms unabhängig ist, wurde der Rückgang der Drehung eines enzymfreien Oxynitrils untersucht. Ein mit Benzol ausgeschütteltes Oxynitril wurde in pufferhaltigem Alkohol gelöst und die Lösung in drei Teile geteilt. Die Ausgangsdrehung war im 2-dm-Rohr 1,15°. Die drei Lösungen wurden bei verschiedenen Temperaturen gehalten und die Drehungen ab und zu kontrolliert (Tabelle XIII).

Tabelle XII.

Temperatur:	0°			25°			35°			60°		
Zeit	Drehung	$AgNO_3$ ccm	Totalsynthese Proz.	Drehung	$AgNO_3$ ccm	Totalsynthese Proz.	Drehung	$AgNO_3$ ccm	Totalsynthese Proz.	Drehung	$AgNO_3$ ccm	Totalsynthese Proz.
5 Minuten	—	—	—	2,10°	—	—	—	—	—	—	—	—
10 "	—	—	—	2,40	—	—	0,85°	3,0	88,0	0,0°	—	—
25 "	—	—	—	2,45	2,5	90,0	0,95	—	—	0,0	3,6	84,7
30 "	—	—	—	2,45	—	—	0,95	—	—	—	—	—
45 "	—	—	—	2,45	—	—	0,95	—	—	—	—	—
1 Stunde	2,60°	—	—	2,45	1,6	93,6	0,95	1,8	92,8	0,0	3,6	84,7
2 Stunden	3,00	2,3	90,8	—	—	—	0,85	—	—	0,0	3,5	86,0
3 "	3,10	1,8	92,8	—	—	—	0,75	1,2	95,2	—	—	—
3,5 "	—	—	—	2,20	1,4	94,4	—	—	—	—	—	—
4,5 "	—	—	—	—	—	—	0,60	—	—	—	—	—
5,5 "	—	—	—	2,10	1,2	95,2	—	—	—	—	—	—
6 "	3,15	1,5	93,9	—	—	—	—	—	—	0,0	3,4	86,4
8 "	—	—	—	2,00	0,8	96,9	0,45	1,75	95,8	—	—	—
25 "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0	3,4	86,4

Tabelle XIII.

Zeit	0°	25°	60°
1 Stunde	1,15°	1,10°	0,10°
4,5 Stunden . .	1,10	0,95	0,05
21 „ . .	1,05	0,55	0,00
30 „ . .	1,05	0,40	0,00
ccm $AgNO_3$ zu 5 ccm Lösung .	0,2	0,4	1,0

Die Silbertitrierung wurde nach 30 Stunden vorgenommen. Es geht aus der Tabelle XIII, wie ich früher gefunden habe, hervor, daß die Racemisierungsgeschwindigkeit mit der Temperatur vergrößert wird. Da das Oxynitril nicht ganz benzolfrei war, kann seine Menge bei der Titrierung nicht genau berechnet werden. Indessen sehen wir, daß die Verschiebung des Gleichgewichts durch die Anwesenheit des Enzyms nicht bedingt war.

Die Angabe von *Rosenthaler*, daß die größte Drehung bei 25 bis 30° erreicht werden sollte, ist offenbar nicht stichhaltig. Bei 0° wird die Drehung größer, ihre Ausbildung aber verläuft langsamer.

Da die Annahme nahe liegt, daß die Hitzeinaktivierung der Oxynitrilese in einer Racemisierung besteht, habe ich einen approximativen Vergleich zwischen den Temperaturabhängigkeiten der zwei Reaktionen angestellt. Die Racemisierungsgeschwindigkeit meines Oxynitrils wird verzehnfacht durch etwa 15° Temperaturerhöhung (30 bis 60°, zweite Abhandlung, S. 394). Die Hitzeinaktivierung erfährt dieselbe Vergrößerung ihrer Geschwindigkeit im Zeitintervall von etwa 6°.

VI. Ergebnisse der Reinigungsversuche. Eigenschaften gereinigter Enzympräparate.

Das *Roh-Emulsin* wird am besten durch Extraktion von Mandelpulver mit schwach alkalischem Wasser hergestellt. Dabei werden die Säuren neutralisiert und das in den Zellen festgehaltene Enzym frei gemacht. Natürlich wird auch eine große Menge inaktiver Substanz herausgelöst. Durch Fällung mit 2 Volumina Aceton wird alles Enzym in einem leichten gelblichen Pulver erhalten. Da viel Mandelöl aus dem Niederschlag frei gemacht wird und nur mit großen Mengen Aceton oder Äther beseitigt werden kann, ist es einfacher, von fettarmem Mandelpulver („Placent“) auszugehen. Man erhält daraus ebenso gute Präparate.

Die *Reinigung des Roh-Emulsins*, d. h. die Beseitigung der inaktiven Beimischungen, habe ich unter Anwendung folgender Methoden versucht:

Dialyse,
Fällung mit Säure,
Sorption mit $Al(OH)_3$ und $Fe(OH)_3$ und Elution,
Fällung mit Bleiacetat,
Fällung mit Tannin.

Mit diesen Methoden können auch Mandelextrakte direkt gereinigt werden.

Dialyse. Das Enzym kann Kollodiumschläuche nicht durchdringen. Durch mehrtägige Dialyse gegen strömendes Wasser kann beinahe alle Asche und etwa die Hälfte der organischen Substanz beseitigt werden, ohne daß die enzymatische Wirkung abnimmt. Eine dialysierte Enzymlösung ist nur nach Zusatz eines geeigneten Elektrolyten mit Aceton fällbar.

Reinigung mit Säure. Bringt man durch Säurezusatz die Acidität der Enzymlösung auf $p_H = 4{,}8$, so wird die größte Menge der Verunreinigungen gefällt. So können aus Roh-Emulsin etwa drei Viertel der Trockensubstanz ohne Enzymverlust entfernt werden.

Tonerdehydrat und Ferrihydrat, nicht aber Kaolin, sorbieren das Enzym, am besten bei $p_H = 6$ bis 7. Das auch im Sorbat wirksame Enzym wird durch Wasser nicht herausgelöst, wohl aber durch Alkali oder noch besser durch alkalische Phophat- oder Arsenatlösung, wobei die Acidität $p_H = 8$ bis 11 die beste Ausbeute gibt. Wiederholte Adsorption hat nicht zum größeren Reinheitsgrad geführt.

Bleiacetat (neutrales oder basisches) fällt das Enzym. Der Niederschlag ist aktiv. Mit H_2S kann das Enzym ausgelöst werden, wobei die Verunreinigungen größtenteils ungelöst bleiben. Durch Wiederholung der Bleiacetatbehandlung kann ein hochaktives Enzympräparat erhalten werden. Unter Zuhilfenahme der früher beschriebenen Methode konnten z. B. 98 Proz. der Verunreinigungen einer Roh-Emulsinlösung ohne wesentliche Abnahme der enzymatischen Wirkung entfernt werden. Durch diese Methode wird der Reinheitsgrad der Oxynitrilese viel mehr gesteigert als der des vergesellschafteten Enzyms β-Glucosidase.

Gereinigte Enzympräparate zeigen keine Eiweißreaktionen und nur schwache Molischreaktion. Die Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure kann dagegen auf Anwesenheit alkaloidartiger Stoffe deuten.

Als obere Grenze des *Molekulargewichts* wurde durch Diffusionsversuche der Wert 5000 erhalten.

Die spezifische Drehung der Enzympräparate sinkt während der Reinigung von etwa -45^0 auf etwa -35^0. Diese spezifische Drehung ist indessen von der Aktivität des Präparats nicht merkbar abhängig.

Stabilität. Das Enzym ist bei Zimmertemperatur sehr stabil, sowohl in saurer als alkalischer Lösung ($p_H = 3$ bis 11). Die Inaktivierungstemperatur, wobei das Enzym während einer Stunde seine halbe Aktivität verliert, liegt ein wenig höher als 75°.

Die optimale Acidität ist $p_H = 5{,}2$ bis 5,4 im alkoholischen Substratgemisch. Da das gereinigte Enzym kein Silbernitrat verbraucht, kann die Oxynitrilbildung sehr bequem durch Silbertitrierung bestimmt werden.

Es ist durch meine Versuche wahrscheinlich gemacht, daß das Enzym mit HCN eine Verbindung eingeht, welche das rechtsdrehende Oxynitril liefert. [Diese Versuche machen die eigentümliche Theorie von *Erlenmeyer*[1]) über die optische Aktivität des Benzaldehyds noch unwahrscheinlicher.] Die d-Oxynitrilmenge ist bei nicht allzu großen Drehungen der Enzymmenge proportional. Das Enzym wird von dem Oxynitril gebunden, und zwar am stärksten von der d-Form. Dies stimmt sehr gut mit der Beobachtung von *Bredig* und *Fiske*[2]), daß bei der Oxynitrilsynthese durch Alkaloide diese sehr kräftig von dem Oxynitril gebunden wurden.

Als spezifische Drehung des d-Oxynitrils gibt *Feist*[3]) den Wert 14° an. *Rosenthaler*[4]) erreichte durch Amygdalinspaltung 27°. Ich habe unter optimalen Versuchsbedingungen den Wert 30° ermittelt (Na-Licht). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von *Krieble*[5]) dürfte daraus hervorgehen, daß dieser Wert die spezifische Drehung des nahezu reinen d-Oxynitrils ist.

Die in den Substratgemischen beobachtete Rechtsdrehung ist der Menge d-Oxynitril proportional. Die Racemisierung des d-Oxynitrils ist von der Anwesenheit des Enzyms unabhängig und wird durch Temperaturerhöhung und Verminderung der Acidität beschleunigt. Durch Temperaturerhöhung wird die Gleichgewichtslage ein wenig gegen größere Spaltung verschoben.

Ehe ich zu einer Zusammenfassung meiner Arbeiten über Oxynitrilbildung übergehe, möchte ich an dieser Stelle auf zwei ältere Hypothesen über die *Wirkungsweise des Enzyms* hinweisen.

1. *Fajans*[6]) setzt den enzymatischen Effekt in Analogie mit der Wirkung einiger bekannter Substanzen, nämlich gewisser Alkaloide wie Chinin und Chinidin. Bei Anwesenheit dieser Stoffe kann nach Belieben das d- oder l-Oxynitril in Überschuß erhalten werden, wenn Benz-

---

[1]) Diese Zeitschr. **64**, 382, 1914.
[2]) Ebendaselbst **46**, 7, 1912.
[3]) Arch. der Pharm. **247**, 226, 1909.
[4]) Ebendaselbst **248**, 105, 1910.
[5]) Journ. Americ. Chem. Soc. **43**, 164, 1921.
[6]) Zeitschr. f. physik. Chem. **73**, 25, 1910.

aldehyd und HCN in Chloroform gemischt werden. Die Ursache des Effektes liegt nach *Bredig* und *Fiske* in der Bindung zwischen Katalysator und Oxynitril. In Übereinstimmung damit habe ich gefunden, daß das Oxynitril (Rechtsform) vom Enzym kräftig gebunden wird. *Fajans* nimmt an, daß die Asymmetrie bei der Synthese dadurch verursacht wird, daß das Emulsin die Spaltung des l-Oxynitrils beschleunigt. *Rosenthaler*[1]) hebt dagegen hervor, daß, wenn also die Emulsinwirkung eigentlich eine asymmetrische *Spaltung* ist, die d-Form entstehen sollte, wenn inaktives Oxynitril in Anwesenheit von Emulsin gespalten wird. Statt dessen entsteht die Linksform in Überschuß.

2. *E. Erlenmeyer*[2]) versucht die asymmetrische Synthese so zu erklären, daß Emulsin und die oben genannten Alkaloide den Benzaldehyd „aktivieren". Benzaldehyd soll nämlich in zwei Spiegelbildisomeren existieren können, und durch Emulsin usw. soll die eine Form in Überschuß gebildet werden. Beide Formen reagieren mit derselben Geschwindigkeit mit HCN, aber die eine Form des Oxynitrils wird in Überschuß gebildet werden. Das Enzym vergrößert also nicht die totale Reaktionsgeschwindigkeit. Das letzte stimmt mit meiner Beobachtung überein, daß bei konstanter Acidität die totale Reaktionsgeschwindigkeit durch Emulsinzusatz nicht merkbar geändert wird.

Die Möglichkeit der Existenz von d- und l-Form des Benzaldehyds, die von *Erlenmeyer* und von *H. Pauly*[3]) hervorgehoben wird, hat *Erlenmeyer* experimentell zu beweisen versucht, er hat dabei aber eine scharfe Kritik von *E. Wedekind*[4]) erfahren. *Krieble*[5]) kommt indessen auch zu dem Schluß, daß zwei Benzaldehyde existieren können, denn Emulsin gibt mit dem Aldehyd des Handels d-Oxynitril, aber mit Aldehyd aus l-Amygdalin l-Oxynitril.

In diesem Zusammenhang sei hervorgehoben, daß die Dissoziation des Benzaldehyds in Betracht gezogen werden muß. Speziell bei Versuchen zur Deutung der p_H-Kurve muß man beachten, daß die Konzentration der reaktionsfähigen Form des Aldehyds ein p_H-Maximum aufweisen kann. Die Dissoziationskonstante des Aldehyds ist zwar sehr klein (etwa 10^{-14}), aber es ist möglich, daß aus der Dihydroxylform eine Art von Zwitterionen gebildet werden kann, welche wahrscheinlich eine große Reaktionsfähigkeit besitzt.

1) Diese Zeitschr. **73**, 760, 1910.
2) Ebendaselbst **64**, 382, 1914.
3) Ebendaselbst **67**, 439, 1914.
4) Ber. **47**, 3172, 1914.
5) Journ. Americ. Chem. Soc. **34**, 716, 1912.

Nach der Valenzelektronformel von *Pauly* können theoretisch zwei stereoisomere Benzaldehyde erwartet werden:

$$\begin{matrix} H \\ C_6H_5 \end{matrix} \!\!\! > \overset{*}{C} < \!\!\! \begin{matrix} 0\!-\!0 \\ 0 \end{matrix} \quad (0 = \text{Elektron}).$$

Wegen der leichten Verschiebbarkeit der Elektronen wäre es schwer, einen eventualen asymmetrischen Aldehyd beizubehalten

Es scheint indessen, als sollte die Annahme von der primären Anlagerung von HCN an das Enzym die Hypothese von verschiedenen Formen des Aldehyds überflüssig machen. Es ist durchaus denkbar, daß die an ein optisch-aktives Alkaloid gebundene Cyanwasserstoffsäure den Aldehyd nur zu der einen Oxynitrilform addiert. Es ist übrigens eine bekannte Tatsache, daß Aldehyde und wässeriges HCN lösliche Salze geben, die bei Erwärmen gespalten werden. Aus absolutem Alkohol können die Salze in kristallisierter Form gewonnen werden, aber beim Stehen an der Luft nehmen sie Wasser auf und zerfallen. In Analogie mit der Bindung des Emulsins an das d-Oxynitril stehen Versuche von *Betti* und *v. Giffen*[1]), die gefunden haben, daß mit der optischen Base β-Hydroxynaphthylbenzylamin racemische Oxynitrile asymmetrisch gespalten werden, wobei kristallisierte Salze optisch aktiver Aldehyd-Basenverbindungen isoliert werden können.

Gewisse andere Beobachtungen stimmen mit der Alkaloidtheorie überein. So haben *Traube* und *Onodera*[2]) gezeigt, daß hochmolekulare Alkaloide, wie Atropin und Chinin, in Wasser sich in kolloider Form lösen, während ihre Salze echte Lösungen bilden. Dies steht möglicherweise mit dem von mir gefundenen hohen Molekulargewicht in Übereinstimmung.

Zusammenfassung meiner Arbeiten über Oxynitrilbildung.

Schon lange ist bekannt, daß viele Aldehyde leicht Cyanwasserstoff addieren und Oxynitrile (Cyanhydrine) liefern. *Rosenthaler*[3]) fand, daß, wenn Emulsin bei der Reaktion anwesend war, die Oxynitrile oft optisch aktiv wurden, Benzoxynitril z. B. rechtsdrehend. Die Synthese dieses Oxynitrils wurde näher von *Rosenthaler* studiert, und er fand unter anderem, daß die Asymmetrie ihr Maximum bei einer bestimmten Temperatur und nach einer bestimmten Zeit erreichte. Er fand auch bei Anwesenheit von Enzym eine Vergrößerung sowohl der Reaktionsgeschwindigkeit als der Ausbeute.

Da die Fähigkeit einer Emulsinlösung, ein optisch aktives Oxynitril zu erzeugen, durch Erwärmung auf 75 bis 80° verloren ging,

---

1) Gazzetta 42, 316, 1912.
2) Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. 1, 35, 1914.
3) Literaturhinweis siehe diese Zeitschr. 118, 16, 1921.

nahm *Rosenthaler* an, daß in dem Emulsinpräparat ein Enzym anwesend sei, das die Bildung des d-Oxynitrils beschleunigt. Dieses Enzym nannte er syn-Emulsin, oder nach dem Nomenklaturvorschlag von *Euler* Oxynitrilese. Da gefunden wurde, daß in gewissen Fällen ein linksdrehendes Oxynitril gewonnen werden konnte, wurde die Existenz von zwei Enzymen, d-Oxynitrilese und l-Oxynitrilese, angenommen. Ersteres konnte gewonnen werden, wenn Emulsin zuerst mit Säure und dann mit Alkali behandelt wurde.

Eine Lösung von Amygdalin wird bekanntlich durch Emulsin gespalten, und man nimmt an, daß Benzoxynitril dabei als Zwischenprodukt auftritt. Das Zerfallen des Oxynitrils in Aldehyd und HCN soll nach *Rosenthaler* durch ein Enzym, dia-Emulsin, geschehen, das aus einer Emulsinlösung dadurch isoliert werden konnte, daß sie mit $MgSO_4$ gefällt wurde, wobei das Enzym ins Filtrat ging.

Im Anschluß an diese Arbeiten von *Rosenthaler* habe ich die Rolle des Emulsins bei der Einstellung des Oxynitrilgleichgewichtes studiert. *Die wichtigsten Resultate meiner Arbeiten werden hier zusammengefaßt.*

1. *Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit.* Über die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acidität sind von mir quantitative Versuche angestellt worden. Daraus geht hervor, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in saurer Lösung klein ist, um gegen den Neutralpunkt zuzunehmen. Wird durch Pufferzusatz die Acidität geregelt, hat die Anwesenheit von Emulsin keinen merkbaren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Ohne Puffer wird die Acidität durch Emulsinzusatz vermindert (Eiweiß und dergleichen bindet Säure), wobei die Synthesegeschwindigkeit wächst. Die in Frage kommende Säure ist Benzoesäure, die ja äußerst leicht bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird.

2. *Vergrößerung der Ausbeute.* Dieselbe Menge Oxynitril wird gewonnen, sei es, daß Emulsin anwesend ist oder nicht, aber wegen der Aciditätsverschiebung wird das Gleichgewicht schneller mit Emulsin erreicht, und man findet nach einer kurzen Zeit eine größere Oxynitrilmenge als ohne Emulsin.

3. *syn- und dia-Emulsin.* Daß das von *Rosenthaler* hergestellte syn-Emulsin die totale Synthese beschleunigt, beruht auf dem Alkaligehalt der Enzymlösung. Ähnliche Aciditätsänderungen sind auch die Ursache davon, daß die Gleichgewichtslage der Oxynitrilspaltung in Wasserlösung bei Anwesenheit von dia-Emulsin schneller erreicht wird.

4. Sämtliche *symmetrisch-kinetischen* Wirkungen werden also als Aciditätswirkungen erklärt, und auf diese können auch mehrere andere der Versuchsergebnisse *Rosenthalers* zurückgeführt werden. So beruht z. B. das Abnehmen der Drehung nicht auf enzymatischer Spaltung

(dia-Emulsin), sondern auf der Racemisierung, deren Geschwindigkeit durch Aciditätsverminderung vergrößert wird.

5. *Enzymatische Wirkung.* Als einzige Wirkung eines enzymatischen Katalysators ist die *optische Aktivität* des Oxynitrils zu betrachten. Um diesen Katalysator, von mir hier Oxynitrilese genannt, zu studieren, habe ich Reinigungsversuche vorgenommen.

6. *Reinigung.* Fettarmes Mandelpulver wird durch alkalisches Wasser extrahiert und der Extrakt mit Aceton gefällt (Reinheitsgrad rund 100). Weitere Reinigungsmethoden:

Dialyse, erhaltener Reinheitsgrad rund 200
Fällung mit Säure, erhaltener Reinheitsgrad rund . 500
Sorption u. Elution, erhaltener Reiheitsgrad rund . 700
Bleiacetatfällung, erhaltener Reinheitsgrad rund . 3000 (zweimal: 10000).

7. *Eigenschaften der Präparate.* Meine reinsten Präparate enthalten kein Eiweiß und nur wenig Kohlehydrat. Das Molekulargewicht dürfte nicht größer als 5000 sein. Die spezifische Drehung der Präparate sinkt ein wenig während der Reinigung. Das Enzym ist sehr stabil bei gewöhnlicher Temperatur. Die Temperatur der halben Inaktivierung bei einstündiger Erhitzung liegt ein wenig über 75°. Die optimale Acidität (in wässrig-alkoholischer Lösung) ist $p_H = 5{,}2$ bis 5,4.

Das Enzym bildet möglicherweise mit HCN eine Verbindung, die den Aldehyd zu d-Oxynitril addiert. Die spezifische Drehung des d-Oxynitrils dürfte 30° nur wenig übersteigen. Die in der Reaktionsmischung beobachtete Drehung ist dem d-Oxynitrilgehalt proportional.

8. *d- und l-Oxynitrilese. Krieble*[1]) fand, daß ein Emulsinpräparat, das mit Amygdalin l-Oxynitril gab, 2 Jahre später rechtsdrehendes Oxynitril erzeugte. Er erklärt dies in folgender Weise: Emulsin enthält zwei synthetisierende Enzyme, von welchen die l-Oxynitrilese schnell zerstört wird. Daß die Präparate *Rosenthalers* d-Oxynitril gaben, sollte darauf beruhen, daß seine Präparate viel älter waren als die von *Krieble*. Diese Erklärung scheint nicht wahrscheinlich. Keines von meinen vielen Präparaten hat in irgend einem Stadium von Reinheit oder Alter l-Oxynitril gegeben. (Einige Präparate wurden teils unmittelbar nach der Darstellung und teils nach mehr als einem Jahre untersucht.) In teilweisem Anschluß an *Rosenthaler* finde ich eine einfachere Erklärung folgendermaßen: Aus Amygdalin wird d-Oxynitril abgespalten und dann in der neutralen Lösung schnell racemisiert. Das Oxynitril zerfällt nun, und wegen der Anwesenheit des Emulsins wird die d-Form schneller gespalten, wobei die Lösung Linksdrehung zeigt. Durch die Annahme, daß die Oxynitrilese sowohl in die Bildung als in die Spaltung

[1]) Biochem. Bull. 2, 227, 1912/13.

des *d-Oxynitrils* eingreift, werden Hypothesen von einem l-Enzym überflüssig. Zur Bekräftigung bedarf indessen dieser Punkt einer weiteren experimentellen Untersuchung.

Weil das Enzym sowohl bei der *Bildung* wie bei der *Spaltung* des d-Oxynitrils teilnimmt, kann es vielleicht unnötig erscheinen, es als ein besonders synthetisierendes Enzym (Oxynitrilese) anzusehen und es könnte wohl auch Oxynitrilase genannt werden. Indessen sind die Eigenschaften und die Wirkungsweise des Enzyms nur durch das Auftreten des optisch aktiven Endproduktes studiert, und es dürfte deshalb angezeigt sein, den Namen Oxynitrilese bis auf weiteres beizubehalten.

Durch meine Arbeiten habe ich gezeigt, daß entgegen der früheren Theorie über die Mitwirkung des Emulsins bei dem Benzoxynitrilgleichgewicht der einzige Effekt des enzymatischen Katalysators die optische Aktivität des Oxynitrils ist.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. *H. v. Euler*, sage ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die vielseitige Unterstützung und das mir stets bewiesene Wohlwollen meinen wärmsten Dank.

Methoden zur Bestimmung von in Wasser gelöstem elementaren Sauerstoff bei Gegenwart von salpetriger Säure.

Von

Gustaf Alsterberg.

(Aus dem zoologischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 8. März 1925.)

I. Die Bedeutung der salpetrigen Säure als störende Substanz bei der O_2-Bestimmung nach Winkler.

Wenn es gilt, elementaren, in Wasser gelösten Sauerstoff quantitativ zu bestimmen, ist ohne Zweifel das Verfahren nach *Winkler* die beste und einfachste aller analytischen Methoden. Leider muß das Wasser ganz rein sein, wenn man die erzielten Resultate als exakt bezeichnen können soll (*Kunz*, 1911), da wenigstens einige Verunreinigungen das Analysenresultat in hohem Grade verschieben. Besonders störend wirkt eine Gegenwart von salpetriger Säure (N_2O_3), von der auch minimale Mengen (1 mg pro Liter) hinreichend sind, um eine Verwendung der Methode von *Winkler* zur O_2-Bestimmung gänzlich unmöglich zu machen.

N_2O_3 wirkt auf die *Winkler*sche O_2-Bestimmung deshalb störend, weil genannte Substanz leichtgebundenen O_2 enthält (im weiteren Teile der Abhandlung werde ich diesen O_2 als „nitriteigener" O_2 bezeichnen), der gleichzeitig anwesende HJ unter Abscheidung von freiem Jod nach der Formel oxydiert:

$$N_2O_3 + 2\,HJ = 2\,NO + H_2O + 2\,J.$$

Besonders mit Rücksicht auf die hydrobiologischen Verhältnisse dürfte indessen so zugeführter nitriteigener O_2 für das Analysenresultat wenig zu bedeuten haben, da in der Natur 1 mg pro Liter übersteigende Werte äußerst selten sein dürften (1 mg N_2O_3 enthält nur 0,15 ccm derartigen nitriteigenen O_2). Von größerer Bedeutung ist dagegen, daß das so entstandene NO mit neu hinzugekommenem elementaren O_2 unter Bildung von N_2O_3 reagiert; O_2 wird von der Bestimmungs-

flüssigkeit aus der Luft absorbiert oder durch die bei der Titration zugesetzten Reagenzien, die immer O_2 gelöst enthalten, zugeführt.

$$4\,NO + O_2 = 2\,N_2O_3.$$

Wie wir sehen, wird N_2O_3 regeneriert, und diese ist dann neuerdings fertig, um nach der ersten Formel zu reagieren. In diesem Falle spielt N_2O_3 die Rolle eines Katalysators (*Plotnikow*, 1907), und dies ist vor allem die Ursache, weshalb sie durch ihre Gegenwart eine so unerhört störende Wirkung ausübt. In der Tat kann 1 mg N_2O_3 eine O_2-Menge von etwa 10 ccm in eine äquivalente Menge J umsetzen. Eine Grenze für die katalytische Wirkung liegt darin, daß die Substanz allmählich zu N_2O_5 oxydiert wird.

II. Ältere Methoden zur Bestimmung von in Wasser gelöstem O_2 bei Gegenwart von salpetriger Säure.

Die Harnstoffmethoden von Lehmann und Noll. Um die N_2O_3 zu eliminieren, hat man verschiedene Methoden ausgearbeitet. Eine derselben, von *Lehmann* und *Noll* ausgearbeitet (*Ohlmüller-Spitta*, 1921, S. 47), besteht darin, daß der Probe Harnstoff zugesetzt wird. Dieser enthält primäre Aminogruppen, die mit N_2O_3 reagieren:

$$CO(NH_2)_2 + N_2O_3 = CO_2 + 2\,H_2O + 2\,N_2.$$

Die Reaktion verläuft indessen sehr langsam (*Alsterberg*, 1924), was ich in einer späteren Abhandlung noch deutlicher werde zeigen können. Ich muß deshalb die Methode für so gut wie unbrauchbar erklären.

Die Chlorierungsmethode von Winkler. Eine andere Methode wurde von *Winkler* (1915) ausgearbeitet. Diese Methode schien recht aussichtsreich zu sein; durch eine eingehendere Untersuchung habe ich jedoch feststellen können, daß auch sie fast unbrauchbar ist. Nach dieser Methode sollte das Wasser zuerst mit Chlor behandelt werden, welches derart zugeführt wurde, daß die Wasserprobe mit Schwefelsäure und einer Lösung von Natriumhypochlorit, letzteres erhalten durch Digerieren von Chlorkalk mit einer Natriumsulfatlösung, versetzt wurde. Das so zugeführte Chlor oxydiert die salpetrige Säure zu Salpetersäure, die ohne störenden Einfluß ist. Das überschüssige Chlor wird durch einen Zusatz von Rhodankalium im Überschuß reduziert, welches der folgenden O_2-Bestimmung nicht schädlich ist. Da Chlor ein sehr starkes Oxydationsmittel ist, wird der Rhodanwasserstoff zu Cyanwasserstoff und Schwefelsäure oxydiert.

Durch experimentelle Ergebnisse habe ich feststellen können, daß die auf eine derartige Chlorierung folgende *Winkler*-O_2-Bestimmung

Störungen ausgesetzt ist, die sich in großen Verlusten von O_2 offenbaren, obwohl das Chlorierungsmittel in bedeutendem Überschuß zugesetzt wurde. Diese Defizite waren besonders deutlich, wenn größere Mengen starker Chlorlauge zur Anwendung gelangten, die durch Digerieren von Chlorkalk mit Natronlauge erhalten wurde, wobei dann natürlich auch zur Reduktion des Überschusses ein größerer Überschuß an Rhodankalium erforderlich war. Die Ursache war indessen nicht in letzterem Stoff eventuell anhaftenden Verunreinigungen zu suchen. Denn sobald man zur Darstellung der Chlorlauge eine ganz andere Methode benutzte, nämlich Chlorgas in gekühlte Natronlauge einleitete, wurde eine Hypochloritlösung erhalten, die auf das Rhodankalium oxydierend einwirkte, ohne daß sich bei der folgenden O_2-Bestimmung Störungen zeigten. Offenbar waren in der mit Chlorkalk als Ausgangsmaterial erhaltenen Chlorlauge irgendwelche Verunreinigungen vorhanden, und diese veranlaßten bei der Reduktion mit Rhodankalium die Bildung von Destruktionsprodukten, welche störend auf die O_2-Bestimmung einwirkten. Hinsichtlich dieser Verunreinigungen in der Chlorlauge kann man mehrere Vermutungen aussprechen. Während meiner letzten analytischen Arbeit, die besonders ein Oxydationsmittel zu finden bezweckte, welches sich leichter als Chlorlauge dosieren läßt, habe ich auch die Wirkung der Chlorite in dieser Hinsicht untersucht. Wurde als Oxydationsmittel Chloritlösung verwendet, von der ein vorhandener Überschuß mit Rhodankalium reduziert wurde, so erhielt man bei der *Winkler*-O_2-Bestimmung *keinen* O_2, wenn auch Parallelproben des gleichen Wassers bei der Analyse ohne vorherige Oxydation hohe O_2-Gehalte zeigten. Nach diesem Resultat zu urteilen, ist es ziemlich wahrscheinlich, daß der Chlorkalk Chlorit enthalten kann, das bei unvollständiger Oxydation von Rhodankalium störende Wirkung besitzen kann.

Unmittelbar nach dem Rhodanzusatz sind indessen keine störenden Destruktionsprodukte vorhanden, denn bei einem Zusatz von Stärkelösung, Jodkalium und eines Tropfens einer schwachen Jodlösung zur Probe nach der Rhodanbehandlung tritt sofort eine Blaufärbung der Flüssigkeit ein. Es ist also offenbar, daß die störenden Stoffe im späteren Teile des Analysenganges entstehen. Dieses Verhalten gibt uns eine Möglichkeit, über die Natur der bei der Oxydation des Rhodans entstehenden Stoffe einige Vermutungen auszusprechen. Wenn auf oxydierbare Schwefelverbindungen nicht allzu starke Oxydationsmittel einwirken, entstehen oft Polythionsäuren. Dies ist der Fall bei der Einwirkung von J auf Thiosulfat (Resultat: Tetrathionsäure), bei der Einwirkung von Ferrichlorid auf SO_2 (Resultat: Dithionsäure) usw. Diese Polythionsäuren haben die Eigentümlichkeit, von Alkali hydrolysiert zu werden, und führen hierbei zur Bildung reduzierender Stoffe.

Es ist leicht einzusehen, daß die chlorige Säure, die ein schwächeres Oxydationsmittel als das freie Chlor ist, das Rhodankalium nicht vollständig oxydiert, sondern statt dessen die Bildung von Polythionsäuren veranlaßt, die beim nachherigen Laugenzusatz zur O_2-Probe in reduzierende Stoffe zerfallen, die die folgende Analyse stören.

Außer diesen schwer kontrollierbaren Verhältnissen litt die von *Winkler* vorgeschlagene Chlorierungsmethode an dem Fehler, daß die Dosierung außerordentlich schwierig war. Hypochloritlösungen sind sowohl hinsichtlich Chlorgehalts als auch Alkalität im höchsten Grade unkonstant. Daß die Unbeständigkeit des Chlorgehalts von Nachteil ist, ist offenbar, da sie ein genaueres Feststellen der Größe des Zusatzes vereitelt. Gleich nachteilig ist Unbeständigkeit der Alkalität, da die Menge des zur Freimachung erforderlichen H_2SO_4-Zusatzes weder zu niedrig noch zu hoch sein darf, denn sonst macht er in beiden Fällen den weiteren Verlauf der O_2-Bestimmung unmöglich.

Aus all dem erhält man den Eindruck, daß die von *Winkler* vorgeschlagene Modifikation in der Praxis sehr schwer zu verwenden ist.

Auch Versuche, das Chlor in Form von chlorgesättigter Eisessiglösung zuzusetzen, sowie dasselbe durch Brom oder Permanganat zu ersetzen, sind mißlungen. In allen diesen Fällen war die Rhodanreduktion der Anlaß zu während des späteren Verlaufs der O_2-Bestimmung auftretenden reduzierenden Stoffen.

Die Korrektionsmethoden von Winkler und Noll. Hinsichtlich der beiden von *Winkler* und *Noll* ausgearbeiteten Korrektionsmethoden (*Ohlmüller-Spitta*, 1921, S. 46), wobei zu Parallelproben Manganichlorid oder Jodkalium und Manganichlorid zugesetzt wird, kann gesagt werden, daß diese die Analysenfehler, die eine eventuell vorhandene Verunreinigung von N_2O_3 hervorruft, gar nicht beseitigen. Der Versuch, eine derartige Korrektion zu erzielen, ist ganz einfach aus dem Grunde zum Mißlingen verurteilt, da wir bei der O_2-Bestimmung mit einem viel zu großen Komplex von nebeneinander verlaufenden Reduktions- und Oxydationsprozessen zu rechnen haben, die unter verschiedenartigen äußeren Umständen, z. B. Verschiedenheiten in der Dosierung in den verschiedenen Fällen, hinsichtlich der Wirkung, die eine Verunreinigung veranlaßt, zu ganz verschiedenen Resultaten Anlaß geben. Bezeichnend ist auch, daß während *Kunz* (1911) die Sache so auffaßt, daß der erhaltene Korrektionswert in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Absicht dieser Korrektionsmethoden zum Hauptresultat der Analyse *hinzugefügt* werden soll, *Tillmans* mit größerem Recht hervorhebt (s. *König*, 1923, S. 739—740), daß der Korrektionswert mit Rücksicht auf die Nitritverbindungen vom Hauptresultat *abgezogen* werden soll. Was wir jedoch vom Analysenresultat subtrahieren, ist der O_2, der zur Oxydation von Nitrit zu Nitrat er-

forderlich ist; die Störung beruht aber, wie wir im Beginn der Abhandlung gesehen haben, auf ganz anderen Ursachen, und die bei der Korrektion erhaltenen Werte haben mit diesen Störungsverhältnissen nichts zu tun. Auch sonst ist der ganze Gedanke hinsichtlich einer Korrektion nach *Winkler* oder *Noll* ganz unmöglich.

Die Neutralisationsmethoden von Clarke und von Hale und Melia. Die besten der bisher ausgearbeiteten Methoden zur Paralysierung des störenden Einflusses von N_2O_3 bei der O_2-Bestimmung nach *Winkler* sind sicherlich die von *Clarke* (1911) und von *Hale* und *Melia* (1913) ausexperimentierten Neutralisationsmethoden, die in den gebräuchlichen Handbüchern merkwürdigerweise ganz unberücksichtigt gelassen werden. Nach diesen Methoden werden die Proben nach dem Lösen der Manganoxydhydratfällung in HCl, entweder mit Magnesiumkarbonat oder mit Kaliumacetat versetzt, wodurch die p_H-Konzentration derart herabgesetzt wird, daß N_2O_3 keine nennenswerte katalytische Wirkung mehr ausüben kann [1]). Doch wird, was auch nicht zu erwarten war, durch dieses Verfahren die Erhöhung des O_2-Wertes durch die Zufuhr nitriteigenen O_2 die N_2O_3 nicht eliminiert.

III. Azidmethoden.

Wenn es gilt, in einer Probe für die O_2-Bestimmung anwesende N_2O_3 zu entfernen, muß man sich, wie letzterwähntes ergeben hat, nach Stoffen und Reaktionen umsehen, die, ohne Oxydationen oder Reduktionen herbeizuführen, doch den gewünschten Effekt zustande bringen. Der Harnstoff, der schon früher erwähnt wurde, reagiert allerdings auf eine derartige Weise, aber mit wenig Energie. Dagegen kann man sich in diesem Zusammenhang an die Reaktionen der Stickstoffwasserstoffsäure erinnern. Diese und auch ihre Salze, die sogenannten Azide, reagieren, wie *Sommer* und *Pincas* (1915) gezeigt haben, sehr energisch mit N_2O_3.

$$N_2O_3 + 2\,HN_3 = 2\,N_2O + 2\,N_2 + H_2O.$$

Wenigstens gegenüber schwächeren Oxydationsmitteln sind die Stickstoffwasserstoffsäure und ihre Abbauprodukte, die bei ihrer Reaktion mit N_2O_3 entstehen, größtenteils indifferent. So tritt in

[1]) Im Referat im Chem. Zentralbl. 1914 befindet sich ein Irrtum, indem dort angegeben wird, daß die Nitrite nach *Hale* und *Melia* (l. c.) erst bei einer Menge von 0,2 Prom. einen störenden Einfluß ausüben. Gleichzeitig sollte angegeben werden, daß die beiden Verfasser die N_2O_3-Konzentration merkwürdigerweise im N_2-Volumen bestimmen, denn sonst werden die angeführten Ziffern vollkommen irreführend.

einer mit Stärkekleister und KJ versetzten Lösung, die Natriumazid und Schwefelsäure enthält, auch bei minimalen Zusätzen von Jodlösung, aber nicht vorher, Blaufärbung ein. In neutraler oder essigsaurer Azidlösung wirkt J auf Azid allerdings oxydierend nach der Formel:

$$2\,NaN_3 + 2\,J = 2\,NaJ + 3\,N_2.$$

Bei Gegenwart von Hyposulfit wird diese Reaktion katalytisch vermittelt, doch kommt sie *in mineralsauren Lösungen nicht zustande* (*Raschig*, 1915), was in diesem Zusammenhang eine sehr wichtige Tatsache ist.

Von größerem Interesse ist es, die Geschwindigkeit festzustellen, mit der die Stickstoffwasserstoffsäure auf die N_2O_3 zerstörend wirkt, denn hiervon ist die Verwendung derselben zur Analyse abhängig. In dieser Hinsicht habe ich einige orientierende Experimente ausgeführt, die trotz ihrer Einfachheit die notwendigen Daten mit wünschenswerter Deutlichkeit lieferten. Gleiche Teile zweier Lösungen, von denen die eine pro 100 ccm 0,2 g KJ, ein wenig NaOH sowie 0,25 mg N_2O_3, die nach dem Lösen von NaOH zugesetzt wurde, und die andere, ebenfalls pro 100 ccm 0,5 ccm konzentrierter H_2SO_4, eine Portion Stärkekleister sowie 5 mg Natriumazid enthielt, wurden unter kräftigem Schütteln zusammengemischt. Hierbei wurde keine Jodabscheidung anzeigende Blaufärbung erhalten oder nur eine sehr schwache, die auf Zusatz eines Tropfens n/100 Hyposulfitlösung verschwand, ohne nach einiger Zeit wieder zu erscheinen. Desgleichen war die Jodabscheidung sehr minimal, wenn die alkalische Jod-Nitritlösung, zu der das früher erwähnte Azidquantum und Stärkekleister zugesetzt waren, mit 1 ccm 50 proz. H_2SO_4 angesäuert wurde. Wurde dagegen in beiden Fällen der Azidzusatz unterlassen, so trat momentan starke Blaufärbung ein. Es ist offenbar, daß das Azid die N_2O_3 zerstört, bevor diese auch nur ihren eigenen nitriteigenen O_2 an gleichzeitig gegenwärtige HJ abgeben konnte. Noch weniger kam es zur katalytischen Wirkung der N_2O_3, obwohl ich bei den früher erwähnten Experimenten auch ein Wasser mit einem O_2-Gehalt von 20 ccm pro Liter verwendete. Das Azid versprach also ein ausgezeichnetes Reagenz abzugeben, wenn es galt, eine O_2-Bestimmungsmethode auszuarbeiten, die sich auch für durch N_2O_3 verunreinigtes Wasser verwenden läßt.

Die Azidnachbehandlungsmethode. Die denkbar einfachste Form für die Azidbehandlung der O_2-Probe besteht darin, daß das Azid dem Erlenmeyerkolben zugesetzt wird, in den die Probe zur Titration aus der *Winkler*-Probeflasche gegossen wird. Das Resultat dieser einfachen Methode sei durch Wiedergabe einer Versuchsserie, bei der diese

analytische Methode zur Anwendung gelangte, beleuchtet und hierbei auf folgende Tabelle (Tabelle I) verwiesen. Alle Proben wurden demselben Wasser entnommen und nach der gewöhnlichen *Winkler*-O_2-Analyse behandelt. Zu den in der zweiten und dritten Kolonne angeführten Proben wurden jedoch 0,5 ccm einer Nitritlösung gesetzt, die so erhalten wurde, daß eine von *Merck* herstammende Nitritlösung von 1 mg N_2O_3 pro Kubikzentimeter mit einem gleich großen Teile konzentrierter Kochsalzlösung versetzt wurde; zur Probe wurden also 0,25 mg N_2O_3 hinzugefügt. Die Kochsalzlösung bezweckte teils, den O_2-Gehalt in diesem Extra-Reagenzzuschuß herabzusetzen, und ferner machte sie die Flüssigkeit schwerer, so daß die beabsichtigte N_2O_3-Menge wirklich in die Flasche gelangte und nicht im Hals verblieb, wodurch sonst Teile der Nitritlösung beim Zustopfen der Probeflaschen verloren gehen würden. Diese faßten 120 bis 125 ccm; der zugesetzten Nitritmenge entsprach also eine Konzentration von etwa 2 mg N_2O_3 pro Liter. Bei der Analyse der einen mit N_2O_3 versetzten Serie von Proben wurde die eben kurz besprochene Methode verwendet, die ich als „Azidnachbehandlungsmethode" bezeichnen werde, im Gegensatz zu einer anderen Methode, über welche in dieser Abhandlung später berichtet wird. Bei dieser Analyse mit Anwendung der Azidnachbehandlung wurde der Erlenmeyerkolben zur Titration, bevor die Probe in denselben eingegossen wurde, mit 5 mg Natriumazid beschickt (in Form einer Lösung, die 5 mg Azid pro 1 ccm enthielt). Darauf wurde die Probeflasche geöffnet und deren Inhalt in den Erlenmeyerkolben übergegossen und die Flüssigkeit zur Durchmischung ein wenig umgeschüttelt. Gleich darauf wurde ein Teil derselben in die Probeflasche zurückgegossen, damit das vorhandene Azid auch die in der Flasche befindlichen Nitritreste zerstören sollte, die sonst während dieser Zeit merkbare Mengen freies Jod hätten abscheiden können. Darauf wurde die Probe endgültig in den Erlenmeyerkolben übergeführt und nach gebräuchlichem Verfahren analysiert. Die Resultate sind in untenstehender Tabelle angeführt, in der die Ziffern die O_2-Menge, ausgedrückt in Kubikzentimetern pro Liter, angeben.

Tabelle I.

Analyse nach *Winkler*			Analyse mit Azidnachbehandlung	Nitriteigener
Ohne Nitrit	Mit Nitrit		Mit Nitrit	O_2
5,34	6,28	Starke Nachbläuung	5,62	0,28
5,35	6,24		5,63	0,28
5,34	6,11		5,64	0,30

Die Analysenresultate zeigen charakteristische Eigentümlichkeiten. In der zweiten Kolonne sind die O_2-Werte von mit Nitritlösung

versetzten Proben angeführt, die aber ganz nach der gewöhnlichen *Winkler*-O_2-Bestimmung ohne Anwendung der Azidnachbehandlung analysiert wurden. Diese O_2-Werte sind, abgesehen davon, daß sie Unbeständigkeit aufweisen, erheblich höher als die Werte in der ersten Kolonne, welche die Analysenresultate von Proben umfassen, die ohne Nitritzusatz nach der gebräuchlichen Methode ausgeführt wurden und den wirklichen O_2-Gehalt angeben. Die Ursache, weshalb die N_2O_3-Anwesenheit so unerhört störend wirkt, haben wir schon zu Beginn der Abhandlung ausführlich besprochen. Ersichtlich ist indessen, daß wir es in vorliegendem Analysenresultat nicht nur mit einer störenden Wirkung des nitriteigenen O_2, sondern auch mit einem katalytischen, von außen zugeführten O_2 zu tun haben. Wir können ohne weiteres den Schlußsatz ziehen, daß auch die Gegenwart von geringen N_2O_3-Mengen die Verwendung der O_2-Bestimmung nach *Winkler* unmöglich macht.

Auch die Werte der dritten Kolonne sind wesentlich höher als die der ersten, aber sie zeigen im Gegensatz zu denen der zweiten Kolonne eine sehr gute Konstanz. Durch die Azidnachbehandlung der Probe wurde die katalytische Wirkung der N_2O_3 ausgeschaltet, der N_2O_3-Zusatz hat aber doch insofern störend gewirkt, als der nitriteigene O_2 zu J umgesetzt wurde. Das Azid greift in die Reaktionskette erst ein, nachdem das in der Probe so entstandene NO *von außen* zugeführten O_2 aufgenommen hat und zu N_2O_3 oxydiert wurde, welches vom Azid augenblicklich zerstört wird. Daß die Störung, die sich bei der Azidnachbehandlungsmethode zu erkennen gibt, wirklich auf einer Zufuhr von nitriteigenem O_2 beruht, ist durch eine einfache Überlegung leicht festzustellen. Eine Menge von 2 mg N_2O_3 soll 0,29 ccm nitriteigenen O_2 enthalten. Die in der vierten Kolonne angeführten Wertdifferenzen zwischen den Zahlen der ersten und dritten Kolonne sollen gerade den analytisch festgestellten nitriteigenen O_2 darstellen, und in der Tat liegen diese Zahlen sehr nahe den theoretischen Werten.

Als allgemeines Resultat kann jedoch verzeichnet werden, daß die Azidnachbehandlungsmethode bei niedrigem N_2O_3-Gehalt für das analytische Ergebnis von großer Bedeutung sein kann. Diese Methode ist noch zuverlässiger als die von *Clarke* (l. c.) und von *Hale* und *Melia* (l. c.) ausgearbeiteten Neutralisationsmethoden und dürfte besonders hinsichtlich hydrobiologischer Ansprüche zu empfehlen sein, da auf Grund der meistens verschwindenden Quantitäten anwesender N_2O_3 ein eventueller Zuschuß von nitriteigenem O_2 nichts zu bedeuten hat.

Die Azidvorbehandlungsmethode. Es dürfte doch meistens eintreffen, daß die größten N_2O_3-Quantitäten unter biologischen Ver-

hältnissen gerade bei niedriger O_2-Konzentration zu erwarten sind. Für die einigermaßen genaue Bestimmung desselben muß ein Vorkommen von N_2O_3 störend sein, wenn es sich auch nur um zugeführten nitriteigenen O_2 handelt. Im genauen Ausführen der Analyse kann man jedoch nur durch das Benutzen einer Methode, die ich die „Azidvorbehandlungsmethode" nennen will, weiter kommen. Da das Azid äußerst rasch wirkt, braucht diese Methode nicht zu bedeuten, daß das Azid auf die gleiche Weise zugesetzt werden soll wie der Harnstoff bei der Harnstoffmethode, sondern das Azid kann vorteilhaft der bei der *Winkler*-O_2-Bestimmung erforderlichen KJ-haltigen Natronlauge zugesetzt werden. Wie wir schon früher bei den orientierenden Versuchen festgestellt haben, spaltet das Azid beim Ansäuern vorhandene N_2O_3 unmittelbar, ohne daß auch der nitriteigene O_2, trotz gleichzeitiger Gegenwart von HJ, wenigstens in nennenswertem Grade störend wirkt. Damit diese Vorbehandlungsmethode zulässig sein soll, muß jedoch klargelegt werden, daß die in der O_2-Probe entstehende oxydierende Manganoxydhydratfällung bei ihrer Lösung in Säuren auf gleichzeitig anwesende Azide nicht oxydierend wirkt. Wie es sich mit all diesen Problemen verhält, soll die folgende tabellarische Zusammenstellung der Versuchsresultate zeigen (Tabelle II). Alle Proben wurden ein und demselben Wasser entnommen. Die in der ersten Kolonne angeführten Proben wurden einfach nach der Methode von *Winkler* analysiert, ohne daß Nitrit oder Azid zugesetzt wurde: die hier angeführten Zahlen bilden die Standardwerte, von denen wir bei der Beurteilung der mit anderen Methoden erhaltenen Resultate ausgehen müssen. In der zweiten Kolonne finden wir die Analysenresultate von Proben, die mit Natriumazid versetzt wurden, um zu untersuchen, ob sich bei der Auflösung der Manganoxydhydratfällung auf Grund einer eventuellen Oxydation der Stickstoffwasserstoffsäure irgend ein Verlust an O_2 geltend macht. In der dritten und vierten Kolonne sind Proben angeführt, die mit der gebräuchlichen Nitritmenge versetzt wurden (0,25 mg N_2O_3). Die Proben der dritten Kolonne wurden nach der Azidvorbehandlungsmethode analysiert, wobei zu der jodkaliumhaltigen Natronlauge (36 g NaOH *ex. Natr. met.*, 20 g KJ und H_2O auf 100 ccm Lösung) so viel Natriumazid gegeben wurde, daß bei der Dosierung der Lauge (1 ccm Lauge für jede Probe) gleichzeitig 5 mg Azid zugesetzt wurden. Die Proben der vierten Kolonne wurden nach der früher beschriebenen Azidnachbehandlungsmethode analysiert. Die zur Bestimmungsserie verwendeten Probeflaschen faßten 120 bis 125 ccm. In der fünften Kolonne finden sich die Werte für nitriteigenen O_2, die Differenzwerte zwischen den Ziffern der ersten und vierten Kolonne bilden.

Tabelle II.

Ohne Nitrit Analyse nach *Winkler*	Ohne Nitrit Analyse mit Azid-vorbehandlung	Mit Nitrit Analyse mit Azid-vorbehandlung	Mit Nitrit Analyse mit Azid-nachbehandlung	Nitriteigener O_2
5,60	5,60	5,62	5,91	0,31
5,65	5,62	5,64	5,92	0,27
5,61	5,61	5,62	5,91	0,30

Auch hier zeigen die Ziffern in den verschiedenen Kolonnen bestimmte Eigentümlichkeiten. Die Werte der zweiten Kolonne sind vielleicht etwas, aber höchst unbedeutend, niedriger als die in der ersten Kolonne angeführten. Es ist also offenbar, daß der Azidzusatz bei der Azidvorbehandlungsmethode kein störendes Moment von Bedeutung bildet. Die kleine Differenz kann übrigens auf einem Ablesefehler bei der Analyse beruhen oder in einer Verunreinigung des Azidpräparats oder auch einem geringen Nitritgehalt des Wassers oder der Reagenzien ihren Grund haben. Desgleichen stimmen die in der dritten Kolonne angeführten Werte, die von den Analysen nach der Azidvorbehandlungsmethode herstammen, gut mit den Standardwerten der ersten Kolonne überein. Daß der vorhandene nitriteigene O_2 eine ziemlich große Fehlerquelle gebildet hat, zeigen die Werte der vierten Kolonne, die bei Analysen nach der Azidnachbehandlungsmethode erhalten wurden. Daß die Differenzen hauptsächlich auf der Anwesenheit von derartigem nitriteigenen O_2 beruhen, zeigen die Differenzwerte der fünften Kolonne; hinsichtlich dieser will ich aber nur auf das bereits Gesagte verweisen (S. 43).

Als allgemeines Resultat dieser Versuchsserie ergibt sich indessen deutlich genug, daß man durch eine Azidvorbehandlung der *Winkler*-O_2-Probe eine störende Wirkung gleichzeitig anwesender N_2O_3 vollständig ausschalten kann. Wie groß der Azidzusatz sein soll, muß man durch Vorversuche feststellen, die man nach der gleichen einfachen Methode ausführt, wie ich sie für die in dieser Abhandlung erwähnten (S. 41) orientierenden Versuche benutzt habe. Das Azid kann den Proben für sich allein in Form einer Lösung zugesetzt werden; in diesem Falle wird sie jedoch zweckmäßig durch Kochsalz schwerer gemacht, wodurch teils erreicht wird, daß die beabsichtigte Menge wirklich in die Probe gelangt, und teils wird die O_2-Menge, die der Analyse durch die Reagenzien zugeführt wird, auf ein Minimum herabgedrückt. Zweckmäßig kann das Azid der KJ-Natronlauge zugesetzt werden und wirken 5 mg Natriumazid unter keinen Umständen störend auf die Analyse ein. Im übrigen sind sowohl neutrale als alkalische Azidlösungen sehr haltbar. Derartige Azidlösungen habe ich 3 bis 4 Monate verwahrt, ohne irgendwelche Veränderung ihrer Wirkung feststellen zu können.

Außerdem gibt uns diese Eigenschaft der Azide, N_2O_3 momentan zu zerstören, in bezug auf die genaue quantitative Bestimmung letzterer Substanz Möglichkeiten und habe ich eine Methode aufgefunden, die, nach ausgeführten Vorversuchen zu urteilen, vielversprechend zu sein scheint.

Zusammenfassung.

1. Auch die Anwesenheit von kleinen Mengen N_2O_3 hat auf die O_2-Bestimmungsmethode nach *Winkler* einen stark störenden Einfluß. Harnstoff wirkt auf N_2O_3 nur wenig energisch zerstörend, und außerdem ist die Dosierung schwierig. Das gleiche ist mit der von *Winkler* ausgearbeiteten Chlorierungsmethode der Fall, deren Resultate oft hinzugelangender Komplikationen halber außerdem sehr unsicher sind. Auch die Korrektionsmethoden von *Winkler* und *Noll* führten nicht zu gewünschtem Resultat. Die besten bisher ausgearbeiteten Wege zur Elimination eines störenden Einflusses der N_2O_3 waren die von *Clarke* und von *Hale* und *Melia* ausexperimentierten Neutralisationsmethoden.

2. Noch größere Möglichkeiten bietet ein Verwenden der Stickstoffwasserstoffsäure, denn in dieser und ihren Salzen (Aziden) haben wir Reagenzien, die auch auf Spuren eventuell vorhandener N_2O_3 zerstörend wirken. Gleichzeitig ist dieses Reagenz leicht zu dosieren.

3. Bei der Anwesenheit geringer Mengen N_2O_3 (unter 1 mg pro Liter) genügt für hydrobiologische Zwecke eine Azidnachbehandlung der *Winkler*-O_2-Probe. Diese Azidnachbehandlung besteht darin, daß die Probe mit einer hinreichenden Menge Azid versetzt wird, nachdem die Manganoxydhydratfällung in H_2SO_4 gelöst wurde.

4. Bei Gegenwart größerer Mengen von N_2O_3 (über 1 mg pro Liter) muß man dagegen eine Azidvorbehandlungsmethode verwenden, die darin besteht, daß entweder die jodkaliumhaltige Natronlauge mit Azid versetzt wird oder daß eine Lösung von Azid in konzentrierter Kochsalzlösung als besonderes Reagenz hinzugefügt wird; von letzterem werden der Probe hinreichende Mengen gleichzeitig mit der jodkaliumhaltigen Natronlauge und dem Manganchlorür zugesetzt. Ein Zusatz von 5 mg Natriumazid zu einer *Winkler*-O_2-Probe von 125 ccm schadet unter keinen Verhältnissen, und die für diese Dosierung notwendige Azidmenge kann in die jodkaliumhaltige Natronlauge eingetragen werden. Diese bekommt folgende Zusammensetzung: 36 g $NaOH$, 20 g KJ, 0,5 g NaN_3 und Aqua dest. zu 100 ccm Lösung. Von dieser Lauge fügt man 1 ccm zur O_2-Probe.

Literatur.

G. Alsterberg, Botaniska notiser. Lund 1924. — *R. W. Clarke*, The Analyst **36**, 1911. — *F. E. Hale* und *Th. W. Melia*, Journ. of Ind. and Engin. Chem. **5**, 1913. — *J. König*, Die Untersuchung landwirtschaftlich und landwirtschaftlich-gewerblich wichtiger Stoffe 1. Bd. Berlin 1923. — *W. R. Kunz*, Inaug.-Diss. Zürich 1911. — *W. Ohlmüller* und *O. Spitta*, Die Untersuchung und Beiurteilung des Wassers und des Abwassers, 4. Aufl. Berlin 1921. — *J. Plotnikow*, Zeitschr. f. physik. Chem. **58**, 1907. — *F. Raschig*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **48**, 2088, 1915. — *F. Sommer* und *H. Pincas*, ebendaselbst, S. 1963. — *L. W. Winkler*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **29**, 1915.

Untersuchungen über Glykogengehalt der Leber.

I. Mitteilung:

Das Verhalten des Blutzuckers und Leberglykogens unter Einwirkung von Morphin.

Von

Nikolaus Frank und **Julius Förster.**

(Mitteilung aus der I. medizinischen Klinik der k. ungar. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 26. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der Pharmakologie sind mehrere Substanzen bekannt, die, wenn sie in den Organismus gelangen, Hyperglykämie hervorrufen; eine Anzahl dieser Substanzen gehört in die Reihe der Narkotica. So rufen Chloroform, Äther, Chloralhydrat, Urethan, Paraldehyd und Morphin Hyperglykämie hervor. Der Weg des Zustandekommens dieser Hyperglykämie ist nicht einheitlich; nach *Pollack* (1) entsteht ein Teil durch Mitwirkung der Nebennieren, ein anderer Teil kann aber auch ohne diese zustande kommen. Laut *Bertram* (2) spielen bei den Hyperglykämien, die bei der Inhalationsnarkose beobachtet werden, beide Faktoren eine Rolle. Was das Morphin anbelangt, gibt *Holm* (3) der Meinung Ausdruck, daß die Morphinwirkung wahrscheinlich peripherisch bedingt ist; zu ihrer Entstehung ist die Funktion der Nebennieren nicht notwendig, das Morphin übt einen direkten Einfluß auf die Leberzellen aus und verursacht in dieser Weise die Glykogenmobilisation. Es ist experimentell nachgewiesen, daß nach Morphindarreichung der Glykogengehalt der Leber sinkt. Töten wir das Tier nach einer bestimmten Zeit, so ist der Glykogengehalt der Leber niedriger als er bei normalen Tieren zu sein pflegt.

Aus den bisherigen Versuchen ist der zeitliche Zusammenhang zwischen der Veränderung des Leberglykogens und Blutzuckers nicht zu ersehen. In den Mechanismus dieses Zusammenhangs trachteten wir durch unsere Versuche Licht zu bringen: wie ist der Ablauf der Hyperglykämie; auf welche Art kommt das Sinken des Leberglykogens

zustande; besteht ein Zusammenhang zwischen den zwei Faktoren oder nicht?

Unsere Versuche führten wir an Kaninchen nach 24stündigem Hungern aus. Wir bestimmten den Blutzucker vor Beginn des Versuchs und verabreichten danach stündlich eine Morphininjektion. Wir begannen den Versuch eine Stunde nach der ersten Injektion und bestimmten von da ab halbstündlich den Blutzucker und das Leberglykogen. Die Glykogenbestimmung in Serien geschah durch Excision kleiner Leberstückchen; soweit es die technischen Verhältnisse erlaubten, geschah die Blutzuckerbestimmung gleichzeitig mit der Bestimmung des Leberglykogens, um den Zusammenhang zwischen den zwei Faktoren zu ermitteln. Zu der Blutzuckerbestimmung entnahmen wir das Blut aus einer Vene des Ohrläppchens, und nur wenn dies aus irgendwelchen Gründen nicht möglich war, nahmen wir Blut aus dem Herzen. Die Zuckerbestimmung geschah nach der von *Z. Ernst* und *Weiss* (4) modifizierten Mikromethode von *Bang*. Das Glykogen bestimmten wir nach *Pflügers* Methode, mit Rücksicht aber auf die Reihenversuche und auf die Kleinheit der zu den Bestimmungen gebrauchten Lebermengen änderten wir das Verfahren teilweise nach unseren Erfahrungen, teilweise nach der Modifikation von *Goldfeder* (5) ab.

Unser Verfahren gestaltete sich folgendermaßen:

1 bis 3 g Leber, mit Wasser abgespült, geben wir in eine dickwandige Zentrifugenröhre von 30 ccm Inhalt und setzen die gleiche Menge 60proz. Kalilauge hinzu. Im Anfang haben wir die Leber verrieben, später wurde aber davon Abstand genommen, weil sich erwiesen hat, daß auf dem 100°-C-Wasserbad die Leber sich binnen 10 bis 15 Minuten vollständig löst. Vor der vollständigen Abkühlung setzten wir die gleiche Menge destillierten Wassers und die doppelte Menge 96proz. Alkohols hinzu. Nach gründlichem Vermischen ließen wir das Ganze 10 bis 12 Stunden stehen. Dann wurde es zentrifugiert und nacheinander mit 66- und 96proz. Alkohol, hiernach mit Äther gewaschen. Der so gewonnene Rückstand wurde auf ein Wasserbad gestellt zwecks Entfernung der Ätherreste; dann lösten wir das Glykogen in wenig heißem Wasser und filtrierten möglichst rasch durch ein kleines Filter in eine 30-ccm-Zentrifugenröhre. Das Glykogen wurde mit der drei- bis vierfachen Menge 96proz. Alkohols gefällt und 4 bis 5 Stunden lang stehengelassen. Nach dem Zentrifugieren setzten wir zwecks Hydrolyse des Glykogens 3 ccm 2,2proz. HCl hinzu. Die Zentrifugenröhre wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, der mit einer längeren Glasröhre versehen war, und für 3 Stunden auf ein 100°-C-Wasserbad gestellt. Dann wurde mit 2 n NaOH gegen Lackmuspapier neutralisiert, das Gemisch womöglich auf 5 ccm ergänzt und filtriert. Die Zuckerbestimmung wurde je nach der Menge des Zuckers nach *Bertrand* oder *Bang* ausgeführt.

Mit der Operation begannen wir, nachdem sich die Morphinwirkung eingestellt hat. Der Hautschnitt wurde parallel dem rechten Rippenbogen ausgeführt und schichtenweise bis zum Peritoneum vorgedrungen. Wir trachteten danach, daß der Blutverlust möglichst klein sei. Die stark gelappte Leber hervorziehend, schnitten wir aus deren Rande 1 bis 3 g schwere

Stückchen ab. Die Blutung wurde entweder mit Muskellappen oder durch Abklemmung gestillt. Durch dieses Verfahren gelang es uns in halbstündigen Intervallen, Leberstücke zu gewinnen und während eines Versuchs fünf bis sechs Glykogenbestimmungen auszuführen.

Unser erster Versuch war nur von kurzer Dauer, doch ist das Sinken des Glykogengehalts gut zu beobachten. Der folgende Versuch zeigt ausdrücklich das Ansteigen des Blutzuckers von 0,11 auf 0,31 Proz. und allmähliches Sinken des Glykogengehalts von 0,99 auf 0,02 Proz. Ganz ähnlich war der Verlauf des dritten Versuchs; der Blutzucker stieg von 0,13 auf 0,24 Proz.; die erste Glykogenbestimmung ergab einen Wert von 0,46 Proz., während nach 3 Stunden 20 Minuten Glykogen nur in Spuren nachweisbar war. Hat das Kaninchen vor den Versuch nicht gehungert (4. Versuch), so sinkt zwar während der Morphinwirkung der Glykogengehalt, aber das Ausschwemmen des Leberglykogens dauert selbstverständlich länger, und es war nach 3 Stunden 50 Minuten noch 1 Proz. Glykogen in der Leber enthalten (s. Tabelle I und Abb. 1).

Tabelle I.

Zeit	1		2		3		4	
	Blutzucker	Leberglykogen	Blutzucker	Leberglykogen	Blutzucker	Leberglykogen	Blutzucker	Leberglykogen
Minuten	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
0	0,12	—	0,11	—	0,13	—	0,13	—
50	0,14	0,10	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	0,99	0,20	—	—	—
70	0,13	0,06	—	—	—	0,46	—	3,44
80	—	—	0,18	—	0,18	—	—	—
90	—	—	—	—	—	—	0,16	—
100	—	—	—	0,65	0,20	0,40	—	2,35
110	—	—	0,28	—	—	—	—	—
130	—	—	—	0,23	0,23	0,16	—	2,84
140	—	—	0,31	—	—	—	0,32	—
150	—	—	—	0,16	0,24	0,04	—	2,17
180	—	—	0,25	—	—	—	—	—
200	—	—	0,25	0,02	0,21	Spuren	—	—
230	—	—	—	—	0,21	Spuren	—	1,06

Nr. 4 ausgenommen, hungerten die Tiere vor dem Versuche 24 Stunden lang.

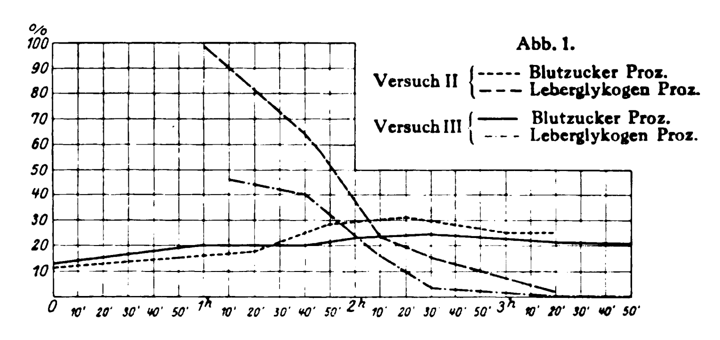


Abb. 1.

Betrachten wir die Veränderung des Blutzuckergehalts, so fällt der Umstand auf, daß der Blutzucker sein Maximum im allgemeinen nach 140 bis 160 Minuten erreicht, um dann allmählich zu sinken. Darum beobachteten wir in den folgenden Versuchen die Änderungen des Blutzuckers, um festzustellen, ob das Sinken ein Zufall war, oder aber ständig zu beobachten sei. Es zeigte sich, daß der Blutzucker im fünften Versuch sein Maximum nach 140 Minuten, im siebenten Versuch nach 150 Minuten erreicht hat, um dann zu sinken. Während eines 24stündigen (sechster) Versuchs erreichte der Blutzucker das Maximum — 0,27 Proz. — nach 120 Minuten und behielt diesen Wert bei auf die Dauer einer halben Stunde. (Das Maximum der Erhöhung fällt im Mittel auf die 150. Minute.) Dann sank allmählich der Blutzucker und erreichte seinen Ausgangswert — 0,12 Proz. — nach 7 Stunden und blieb 4 Stunden lang, von kleinen Schwankungen abgesehen, auf diesem Niveau.

In Anbetracht dessen, daß trotz fortwährender Morphindarreichung der Blutzucker auf seinen Anfangswert sinkt, und daß in unseren Versuchen parallel mit der Erhöhung des Blutzuckers ein Sinken des Leberglykogens einhergeht, können wir mit großer Wahrscheinlichkeit darauf schließen, daß ein abermaliges Ansteigen des Blutzuckers nach wiederholter Morphingabe darum nicht zustande kommt, weil das Depot des Leberglykogens vollständig ausgeschwemmt war. Während der weiteren Dauer des Versuchs bekam das Kaninchen in der Nacht kein Morphin und hungerte weiter. Als wir am Morgen den Blutzucker bestimmten, bekamen wir wiederum 0,12 Proz. (s. Tabelle II). Nach Morphin entstand wieder Hyperglykämie aller Wahrscheinlichkeit nach darum, weil in der Leber des hungernden Kaninchens während der Nacht Glykogen entstanden ist und aufgestapelt wurde. Durch diesen Versuch erhalten wir einen interessanten Einblick in den regulierenden Mechanismus des Organismus, mit dessen Hilfe er auch nach Verlust seiner Glykogendepots den normalen Blutzuckerspiegel aufrecht erhalten kann. Es gelingt also nicht, das Kaninchen durch Morphingaben hypoglykämisch zu machen. In Betracht dessen, daß das Tier keine Muskelarbeit verrichtet, ist es fraglich, ob durch gleichzeitig verrichtete Muskelarbeit keine Hypoglykämie zu erreichen wäre. Ähnliche Beobachtungen machte auch *Embden*; seine Versuche zeigten nämlich, daß durch Strychninvergiftung praktisch glykogenfrei gemachte Tiere einen normalen Blutzuckerspiegel aufweisen.

Tabelle II.

Zeit	5	6	7	Zeit	5	6	7
	Blutzucker in Proz.				Blutzucker in Proz.		
0	0,13	0,12	0,10	5h	—	0,20	0,17
1h	—	0,13	—	6	—	0,17	0,16
1 10′	0,16	—	—	7	—	0,12	0,14
1 20	—	—	0,18	8	—	0,12	—
2	—	0,27	—	9	—	0,14	—
2 20	0,26	—	—	10	—	0,11	—
2 30	—	—	0,27	11	—	0,11	—
3	—	0,27	—	24	—	0,12	—
3 40	0,21	—	—	26	—	0,18	—
4	—	0,21	0,18				

In unseren ersten Versuchen haben wir im allgemeinen weniger Morphin verabreicht, später gingen wir auf größere Gaben über. Schon 0,005 bis 0,01 g Morphin pro Körperkilogramm verursachte eine Glykogenmobilisation und Hyperglykämie. Das Erhöhen der Morphingaben auf 0,03 g pro Körperkilogramm hat weder die Glykogenmobilisation beschleunigt, noch hatte es Einfluß auf den Grad der Hyperglykämie.

Zusammenfassung.

1. Die nach Morphingaben entstehende Hyperglykämie erreicht ihren Höhepunkt beiläufig nach 2½ Stunden, um dann wieder auf den Normalwert zu sinken.

2. Morphin mobilisiert das Leberglykogen; wie die *Reihenversuche* zeigen, geschieht dieses Sinken allmählich. In der Leber des durch Morphin glykogenfrei gemachten Kaninchens entsteht auch während des Hungerns Glykogen.

3. Das Steigen des Blutzuckers fällt auf den Zeitpunkt der Glykogenmobilisation; nach der Ausscheidung der Depots sinkt der Blutzucker auf seinen Normalwert. Die Glykogenmobilisation und die Hyperglykämie sind unter bestimmten Grenzen unabhängig von der Menge des gegebenen Morphins.

Untersuchungen über den Glykogengehalt der Leber unter verschiedenen Verhältnissen sind im Gange.

Literatur.

1) *Pollack*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 1923. — 2) *Bertram*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **87**, 1923. — 3) *Holm*, ebendaselbst. — 4) *Ernst* und *Weiss*, Wien. klin. Wochenschr. 1921. — 5) *Goldfeder*, Biol. Listu č. 3, roč. X.

Einfluß der Neutralsalze auf die Säurebindung der Gelatine.

Von

Josef Csapó.

(Aus dem physiologischen Institut der k. ung. Pázmány-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

Noch im Jahre 1913 haben sich *Manabe* und *Matula*[1]) mit der Säurebindung der Eiweißkörper beschäftigt und gleichzeitig auch die Wirkung der Salze auf die Säurebindung untersucht. Die von ihnen angewandten Salzkonzentrationen waren aber zu klein, um eine Wirkung auf die Säurebindung im positiven oder negativen Sinne hervorzurufen. In einer aus anderen Gründen ausgeführten Untersuchungsserie habe ich erfahren, daß das NaCl in n/10 Konzentration die Salzsäurebindung des Serumalbumins steigert. Da das Albuminchlorid sich aus einer starken Säure und schwachen Base zusammensetzt und infolgedessen einer beträchtlichen Hydrolyse unterworfen ist, dachte ich zuerst an die Möglichkeit, daß die aus dem NaCl stammenden Cl-Ionen die Dissoziation des Albuminchlorids zurückdrängen, welche Dissoziationszurückdrängung zur Herabsetzung des Hydrolysengrades und dadurch zur Steigerung der Salzsäurebindung führt. Um mich von der Richtigkeit dieser Hypothese zu überzeugen, stellte ich mir die folgende Frage: Handelt es sich bei der oben angegebenen Wirkung des NaCl um einen im Sinne des Massenwirkungsgesetzes verlaufenden Vorgang oder um eine reine Salzwirkung? Mit anderen Worten: Wird die HCl-Bindun der Eiweißkörper durch die Cl-Ionen allein oder auch durch die übrigen Anionen (NO_3, J, SO_4) gesteigert?

In den letzten Jahren ist *J. Loeb*[2]) auf Grund seiner Forschungsergebnisse zu der Überzeugung gekommen, daß die Proteine sich bei der Säure-, Lauge-, Salzbindung wie Kristalloide verhalten. Diese Untersuchungen sind auch geeignet zu entscheiden, ob die Annahme *J. Loebs* in allen Einzelheiten wirklich besteht? Verhalten sich die

[1]) *Manabe* und *Matula*, diese Zeitschr. **52**, 369, 1913.

[2]) *Jacques Loeb*, Proteins and the theory of colloidal bihavior 1922.

Proteine bei der Säurebindung tatsächlich wie Kristalloide, so ist eine Steigerung der Salzsäurebindung nur beim NaCl-Zusatz zu erwarten. Sind aber andere Natriumsalze im gleichen Sinne wirksam, so kann diese Erscheinung nach den Gesetzen der Kristalloidchemie nicht erklärt werden.

Ich habe bei meinen Untersuchungen eine Serie von verschiedenen Säure-Salzmischungen von gleicher c_H hergestellt, zu jedem Gliede der Serie gleiche Mengen einer Eiweißlösung von bekannter Konzentration zugegeben und die gebundene Säuremenge mit physikochemischen Wasserstoffionenkonzentrationsmessungen genau bestimmt.

Methodik.

Käufliche Gelatine wurde mit Essigsäure nach *Loebs* Vorschrift behandelt, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und im Thermostaten von 80° C getrocknet. Aus der trockenen Gelatine bereitete ich zu jeder Untersuchungsserie frische Lösungen. Die p_H der stark opaleszierenden Gelatinelösungen betrug 4,68. Die Konzentration wurde nach der Methode von *Kjeldahl* bestimmt. Zur Herstellung von Säure-Salzmischungen dienten mir als Stammlösungen n/10 Säure- und normale Salzlösungen. Zwei Serien wurden stets von den Säure-Salzmischungen parallel hergestellt: gelatinefreie und gelatinehaltige. Bei Herstellung dieser Serien pipettierte ich in zwei Erlenmeyerkolben je nachdem 2,4 bis 2,6 ccm n/10 Säure und 7,5 ccm normale Salzlösung, ersetzte dann die gelatinefreie Serie mit destilliertem Wasser auf 25 ccm. In der gelatinehaltigen Serie setzte ich statt 10 ccm Wasser 10 ccm von der Gelatinestammlösung. Dann bestimmte ich die c_H der beiden Serien mit elektrometrischen Messungen. Die Differenz in der c_H der gelatinefreien und gelatinehaltigen Lösung ergab die Menge der gebundenen Wasserstoffionen bzw. der Säure. Da die Säurebindung der Eiweißkörper von der c_H stark abhängt, so trachtete ich immer danach, daß die c_H der gelatinefreien Säure-Salzmischungen sich stets um $c_H = 10^{-2}$ bewege.

Es wurde zuerst der Einfluß der Anionen auf die Salzsäurebindung untersucht. Konzentration der Gelatinestammlösung 2 Proz. Kation: Natrium.

Tabelle I.

Gelatinefrei		Anion	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H1}	c_{H1}	
1,983	$1,04 \cdot 10^{-2}$	—	2,303	$4,98 \cdot 10^{-3}$	$5,42 \cdot 10^{-3}$
1,983	$1,04 \cdot 10^{-2}$	Cl	2,39	$4,07 \cdot 10^{-3}$	$6,33 \cdot 10^{-3}$
2,00	$1 \cdot 10^{-2}$	J	2,452	$3,53 \cdot 10^{-3}$	$6,47 \cdot 10^{-3}$
1,965	$1,08 \cdot 10^{-2}$	NO_3	2,338	$4,59 \cdot 10^{-3}$	$6,21 \cdot 10^{-3}$
2,01	$9,77 \cdot 10^{-3}$	SO_4	2,116	$7,66 \cdot 10^{-3}$	$2,11 \cdot 10^{-3}$

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß die Fähigkeit der Salze, die Salzsäurebindung zu steigern, sich nicht allein auf das NaCl beschränkt, sondern auch bei NaJ und $NaNO_3$-Zusatz zu beobachten ist, während das Na_2SO_4 die Salzsäurebindung stark herabsetzt. Die Steigerung der Salzsäure-

bindung durch Salze ist also kein nach dem Massenwirkungsgesetz erklärbarer Vorgang, denn in diesem Falle würden nur die Chloride die Fähigkeit der Steigerung der Salzsäurebindung besitzen. Hier haben wir es teils mit einer Salzwirkung zu tun, denn alle einwertigen Anionen sind in gleichem Sinne und fast in gleichem Grade wirksam, teils mit Ionenwirkung, denn das zweiwertige SO_4-Ion entfaltet eine dem einwertigen entgegengesetzte Wirkung.

J. Loeb hat neuerdings die Theorie aufgestellt, daß die Eiweißkörper an der sauren Seite des isoelektrischen Punktes nur mit Anionen, an der alkalischen Seite nur mit Kationen in Reaktion treten können. Setzt man zu einer Gelatinelösung Salzsäure oder NaCl, so bildet sich an der sauren Seite des isoelektrischen Punktes in beiden Fällen Gelatinechlorid, die Kationen beeinflussen die Eiweißkörper im sauren Medium überhaupt nicht, sie werden von ihnen nicht gebunden. Wird zu einer Gelatinechloridlösung (Gelatine + Salzsäure) Na_2SO_4 gegeben, so findet sich nach *Loebs* Auffassung teils ein Austausch zwischen Chlor und Sulfationen so, daß neben Gelatinechlorid auch Gelatinesulfat entsteht. *Loebs* Theorie scheint mit den Ergebnissen der oben angeführten Messungen nicht vereinbar zu sein, denn geben wir zu einer Gelatinechloridlösung NaCl, so kann ein Austausch zwischen den Chlorkomponenten der beiden Salze stattfinden, es bildet sich wieder NaCl und Gelatinechlorid in äquivalenter Menge, die c_H darf sich aber in dem Falle nicht verändern und infolgedessen die Menge der gebundenen Salzsäure im NaCl-haltigen Medium diejenige im NaCl-freien nicht übertreffen. Dies ist aber nicht der Fall. Beim NaCl-Zusatz wird die Salzsäurebindung deutlich gesteigert. Ich kann dies nur so erklären, daß das NaCl mit den Eiweißkörpern in Reaktion tritt, dabei entsteht ein Gelatine-NaCl-Komplexsalz, dadurch wird aber der chemische Charakter der Eiweißkörper so verändert, daß sie die Fähigkeit einer Mehrbindung an Salzsäure besitzen. Ich schließe mich vielmehr der Ansicht *Paulis* an, nach welcher die Eiweißkörper gleichzeitig mit Säuren und Salzen in Reaktion treten können. Es werden vielleicht infolge der Salzbindung Primärvalenzen frei, welcher Umstand zur gesteigerten Säurebindung führt. Im Gegenteil der Na_2SO_4-Zusatz dürfte zur Herabsetzung der Primärvalenzen und infolgedessen zur Verminderung der Säurebindung führen.

Im folgenden wurde der Einfluß der genannten Salze auf die Salpetersäurebindung untersucht. Konzentration der Gelatinestammlösung 2 Proz. Kation: Natrium.

Tabelle II.

Gelatinefrei		Anion	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H1}	c_{H1}	
1,993	$1{,}01 \cdot 10^{-2}$	—	2,334	$4{,}64 \cdot 10^{-3}$	$5{,}46 \cdot 10^{-3}$
2,0	$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	Cl	2,41	$3{,}89 \cdot 10^{-3}$	$6{,}11 \cdot 10^{-3}$
2,02	$9{,}46 \cdot 10^{-3}$	J	2,469	$3{,}40 \cdot 10^{-3}$	$6{,}06 \cdot 10^{-3}$
2,02	$9{,}46 \cdot 10^{-3}$	NO_3	2,464	$3{,}44 \cdot 10^{-3}$	$6{,}02 \cdot 10^{-3}$
2,01	$9{,}80 \cdot 10^{-3}$	SO_4	2,13	$7{,}41 \cdot 10^{-3}$	$2{,}39 \cdot 10^{-3}$

Die Salpetersäurebindung wird nicht nur durch die Nitrate, sondern auch durch die Chloride und Jodide wesentlich gesteigert, durch die Sulfate dagegen stark herabgesetzt. Die Differenz in der Wirkung der Chloride, Nitrate und Jodide bewegt sich innerhalb der Fehlergrenze, es konnte keine regelmäßige Reihe festgestellt werden.

Setzen wir, zu *Loebs* Theorie wieder zurückgekehrt, zu einer Gelatinenitratlösung NaCl, so entsteht infolge des Anionenaustauschs neben Gelatinenitrat auch Gelatinechlorid und neben NaCl auch $NaNO_3$. Beide Salze: NaCl, $NaNO_3$, sind vollständig neutral, ändern also die c_H der Gelatinenitratlösung überhaupt nicht. Die c_H der salzfreien Gelatinenitratlösung betrug $4{,}64 \cdot 10^{-3}$, die der NaCl-haltigen $3{,}89 \cdot 10^{-3}$. Durch die Anwesenheit von NaCl erfährt also die c_H der Gelatinenitratlösung eine starke Abnahme, welche durch einfachen Anionenaustausch nicht erklärt werden kann. Es bleibt also nichts übrig, als eine erhöhte Säurebindung im NaCl-haltigen Medium anzunehmen.

Dieselben Resultate habe ich auch im schwefelsauren Medium erhalten. Konzentration der Gelatinestammlösung 1,82 Proz. Kation: Natrium.

Tabelle III.

Gelatinefrei		Anion	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H1}	c_{H1}	
2,022	$9{,}51 \cdot 10^{-3}$	—	2,341	$4{,}56 \cdot 10^{-3}$	$4{,}95 \cdot 10^{-3}$
1,995	$1{,}01 \cdot 10^{-3}$	Cl	2,336	$4{,}61 \cdot 10^{-3}$	$5{,}49 \cdot 10^{-3}$
2,00	$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	J	2,362	$4{,}35 \cdot 10^{-3}$	$5{,}65 \cdot 10^{-3}$
2,00	$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	NO_3	2,38	$4{,}17 \cdot 10^{-3}$	$5{,}83 \cdot 10^{-3}$
2,02	$9{,}55 \cdot 10^{-3}$	SO_4	2,123	$7{,}53 \cdot 10^{-3}$	$2{,}02 \cdot 10^{-3}$

Die Chloride, Nitrate, Jodide, Sulfate wirken auch im schwefelsauren Medium ebenso wie im salz- und salpetersäurehaltigen.

Bisher wurde gezeigt, daß die Sulfate die Säurebindung überall stark herabsetzen. Im salzfreien Medium ist aber keine große Differenz in der Salzsäure-, Salpetersäure- und Schwefelsäurebindung zu konstatieren. Das stimmt mit dem Befunde *Loebs* vollständig überein. Nun wissen wir aus *Paulis* Untersuchungen, daß die Eiweißkörper desto mehr Säure binden, je größer die c_H ist. Es ist fraglich, ob diese Regel auch bei der Schwefelsäurebindung gültig ist? Ich habe daher die Säurebindung in Salzsäure und Schwefelsäure bei gleicher c_H parallel bestimmt. Konzentration der Gelatinestammlösung 2 Proz.

Tabelle IV.

Gelatinefrei		HCl	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H1}	c_{H1}	
1,996	$1{,}01 \cdot 10^{-2}$	0,01 n	2,31	$4{,}90 \cdot 10^{-3}$	$5{,}20 \cdot 10^{-3}$
1,695	$2{,}02 \cdot 10^{-2}$	0,02 n	1,828	$1{,}486 \cdot 10^{-2}$	$5{,}32 \cdot 10^{-3}$
1,525	$2{,}99 \cdot 10^{-2}$	0,03 n	1,608	$2{,}466 \cdot 10^{-2}$	$5{,}24 \cdot 10^{-3}$

Tabelle V.

Gelatinefrei		H_2SO_4	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H1}	c_{H1}	
2,012	$9{,}73 \cdot 10^{-3}$	0,01 n	2,35	$4{,}46 \cdot 10^{-3}$	$5{,}27 \cdot 10^{-3}$
1,755	$1{,}76 \cdot 10^{-2}$	0,02 n	1,901	$1{,}26 \cdot 10^{-2}$	$5{,}0 \cdot 10^{-3}$
1,61	$2{,}455 \cdot 10^{-2}$	0,03 n	1,698	$2{,}01 \cdot 10^{-2}$	$4{,}45 \cdot 10^{-3}$
1,506	$3{,}12 \cdot 10^{-2}$	0,04 n	1,565	$2{,}72 \cdot 10^{-3}$	$4{,}0 \cdot 10^{-3}$

In Salzsäure erreichte ich schon bei $p_H = 2,31$ eine maximale Säurebindung, welche auch bei Steigerung der Säurekonzentration unverändert blieb. Im Gegenteil war in der Schwefelsäure mit der Steigerung der Säurekonzentration eine Herabsetzung an Säurebindung zu konstatieren.

Nach den Anionen ging ich auf die Untersuchung der Kationenwirkung über. Konzentration der Gelatinestammlösung 1,62 Proz. Anion: Cl.

Tabelle VI.

Gelatinefrei		Kation	Gelatinehaltig		Gebundene H-Ionen
p_H	c_H		p_{H_1}	c_{H_1}	
1,993	$1,016 . 10^{-2}$	K	2,315	$4,84 . 10^{-3}$	$5,32 . 10^{-3}$
2,01	$9,77 . 10^{-3}$	Na	2,36	$4,36 . 10^{-3}$	$5,41 . 10^{-3}$
1,986	$1,033 . 10^{-2}$	Ba	2,32	$4,79 . 10^{-3}$	$5,54 . 10^{-3}$
2,01	$9,77 . 10^{-3}$	Ca	2,381	$4,16 . 10^{-3}$	$5,61 . 10^{-3}$

Die Säurebindung der Gelatine wird außer Natrium auch durch Kalium-, Barium- und Calciumsalze gesteigert. Bei dieser Serie ist mir aufgefallen, daß die Kationen sich in einer Reihe ordnen, welche der *Hofmeister*schen Reihe vollständig entspricht (K $<$ Na $<$ Ba $<$ Ca). Die Differenz zwischen der Wirkung der einzelnen Kationen ist nicht groß. Um mich zu überzeugen, daß diese Reihenordnung kein Zufall sei, habe ich mit den Endgliedern der Reihe (K- und Ca-Salzen) die Messungen öfters wiederholt. Als Resultat erhielt ich, daß die Säurebindung durch Calciumsalze in höherem Maße gesteigert wird als durch Kaliumsalze bei gleichem Anion. Es scheint also, daß die Kationen im sauren Medium verschiedene Wirksamkeit entfalten. Bei den einwertigen Anionen konnte ich keine regelmäßige Reihe feststellen, die Wirkungsdifferenz blieb innerhalb der Fehlergrenze, nur das zweiwertige SO_4-Ion bildete eine Ausnahme, welches im Gegensatz zu den einwertigen die Säurebindung herabsetzte. Bei den Kationen konnte ich dagegen eine regelmäßige Reihe konstatieren. Dieser Befund ist mit *Loebs* Auffassung, daß die Kationen an der sauren Seite des isoelektrischen Punktes unwirksam sind, nicht vereinbar, spricht aber neben der anderen, von verschiedenen Autoren vertretenen Ansicht dafür, daß die Salzwirkung sowohl im sauren als im alkalischen Medium aus der Anion- und Kationwirkung summiert.

Zusammenfassung.

1. Die Salzsäure-, Salpetersäure- und Schwefelsäurebindung der Gelatine wird durch NaCl, $NaNO_3$, NaJ gesteigert, durch $NaSO_4$ herabgesetzt.

2. In 0,02 bis 0,03 n Schwefelsäure ist die Säurebindung der Gelatine geringer als in Salzsäure bei gleicher Konzentration.

3. Die Kationen ordnen sich hinsichtlich der Steigerung der Säurebindung der *Hofmeister*schen Reihe entsprechend: K $<$ Na $<$ Ba $<$ Ca

Über die Oxydation von Dioxyaceton und Glycerinaldehyd in Phosphatlösungen und die Beschleunigung der Oxydation durch Schwermetalle.

Von

Franz Wind.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Die Tatsache, daß Fructose in neutraler Phosphatlösung durch molekularen Sauerstoff oxydiert wird[1]), gab den Anlaß, auf Vorschlag von Herrn *O. Warburg* das Verhalten einiger anderer Kohlehydrate in Phosphatlösungen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß Sorbose – ebenfalls eine Ketohexose — sich ähnlich verhält wie Fructose, daß auch Dioxyaceton und Glycerinaldehyd[2]) in neutraler Phosphatlösung oxydiert werden, und zwar 20- bis 30mal schneller als Fructose oder Sorbose. Diese größere Oxydationsgeschwindigkeit gibt die Möglichkeit, die Reaktion praktisch bis zu Ende zu verfolgen: 1 Mol Dioxyaceton bzw. Glycerinaldehyd verbraucht insgesamt 1,5 Mol O_2. Bei der Oxydation wird Kohlensäure gebildet; das Verhältnis CO_2/O_2 ist etwas größer (durchschnittlich über 0,4) als es bei der Fructose gefunden wurde (0,3).

O. Meyerhof und *K. Matsuoka* haben gezeigt[3]), daß die Oxydation der Fructose in Phosphatlösungen durch Eisen, Mangan und Kupfer beschleunigt, durch Blausäure und Natriumpyrophosphat gehemmt

---

[1]) *O. Warburg* und *M. Yabusoe*, Oxydation der Fructose in Phosphatlösungen, diese Zeitschr. **146**, 380, 1924.

[2]) Sorbose und Dioxyaceton erhielt ich von Herrn Dr. *Hermann L. Fischer*, Glycerinaldehyd von Herrn Prof. *C. Neuberg*. Ich spreche beiden Herren auch hier meinen Dank aus.

[3]) *O. Meyerhof* und *K. Matsuoka*, Über den Mechanismus der Fructoseoxydation in Phosphatlösungen, diese Zeitschr. **150**, 1, 1924.

wird, und schlossen daraus, daß es sich bei der Oxydation der Fructose in Phosphat um eine Metallkatalyse handle.

Da Eisen nach der Arbeit von *Meyerhof* und *Matsuoka* nur in schwach alkalischer Lösung oxydationsbeschleunigend wirkte, andererseits aber die Oxydationsgeschwindigkeit der Fructose bei neutraler Reaktion groß ist und Natriumpyrophosphat bei *neutraler* Reaktion hemmt, so bestand hier eine Lücke, die ich versucht habe auszufüllen.

Es zeigte sich, daß bei neutraler Reaktion die Reihenfolge, in der man die Stoffe des Systems mischt, von Einfluß ist. Löst man nämlich die Fructose zuerst in Phosphat und fügt dann Metallsalz hinzu, so ist eine Beschleunigung kaum wahrnehmbar; gibt man aber zu Fructose und ganz wenig Wasser zuerst Metall (bzw. die Lösung eines solchen) und dann das Phosphat, so findet man eine beschleunigende Wirkung der Metalle. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse für die oxydationshemmende Wirkung der Komplexbildner insofern, als sie stärker hemmen, wenn man sie *vor* dem Phosphat zusetzt.

Es wurde somit der von *Meyerhof* und *Matsuoka* gezogene Schluß bestätigt, daß die Oxydation der Fructose in neutralem Phosphat eine Metallkatalyse ist, zum mindesten so weit, als die Komplexbildner die Oxydation hemmen (90 Proz.). Ob dieses auch für die Oxydation der Fructose, die bei alkalischer Reaktion eintritt, gilt, ist eine Frage, die ich offen lasse und die auch von geringerem Interesse zu sein scheint.

Die Oxydation des Dioxyacetons und Glycerinaldehyds in Phosphat unterscheidet sich, abgesehen von ihrer größeren Geschwindigkeit, nicht wesentlich von der Oxydation der Fructose. Man findet auch hier die Oxydationshemmung durch Komplexbildner und die Oxydationsbeschleunigung durch Schwermetalle, so daß auch diese Oxydation als Sauerstoffübertragung durch Schwermetalle aufgefaßt werden muß, jedenfalls soweit die Komplexbildner die Oxydation hemmen (90 Proz.).

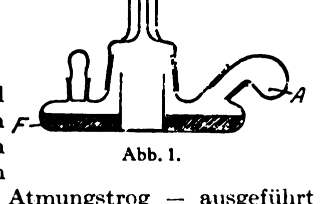


Abb. 1.

Methodisches.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensäurebildung wurde nach der von *O. Warburg* und *M. Yabusoe* angegebenen Methode — Messung des Gasdrucks in einem mit einem Barcroftmanometer verbundenen Atmungstrog — ausgeführt (s. Abb. 1). Die Versuche wurden in reinem Sauerstoff bei einer Temperatur von 37,5° gemacht.

p_H wurde durch Vergleich mit den *Sörensen*schen Standardgemischen mit Indikatoren bestimmt, die Zahlen sind also nur als Näherungswerte zu betrachten.

Angaben über Zusammensetzung der Lösungen und die benutzten Konzentrationen sind jeweils den Kurven und Tabellen beigefügt.

I.

1. *Sorbose.*

Abb. 2 zeigt die Geschwindigkeit der Oxydation der Sorbose in Phosphatlösungen. Die Anfangsgeschwindigkeit ist derjenigen der Fructose ungefähr gleich[1]), und zwar werden pro Stunde etwa 0,3 Proz. des Sorbosegewichts an Sauerstoff verbraucht (auf 95 mg Sorbose 190 ccm O_2). Wegen der Schwierigkeit der Beschaffung einer größeren Menge des Präparats und der offenbar großen Ähnlichkeit im Verhalten mit der Fructose unterblieben weitere Versuche.

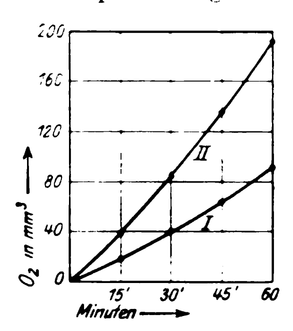


Abb. 2. 0,95 proz. Sorbose in m/1 Phosphatlösung. (9,5 ccm sekund., 0,5 ccm prim. Phosphat. p_H etwa 8,0.) Kurve I: 5 ccm. Kurve II: 10 ccm.

2. *Dioxyaceton.*

Oxydationsgeschwindigkeit.

Ganz erheblich größer ist die Oyxdationsgeschwindigkeit des Dioxyacetons. 1,69 mg der Substanz verbrauchen in der ersten Stunde 187 cmm O_2 (Abb. 3), also etwa 15 Proz. des Eigengewichts. Rechnet man in Mole um, so verbrauchen Fructose und Sorbose etwa 1,6 bis 1,7 Proz. O_2 pro Stunde, Dioxyaceton aber 44 Proz., also 26- bis 27 mal

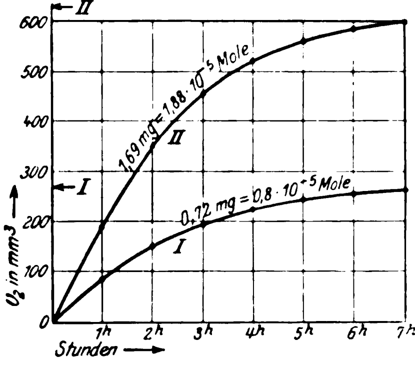


Abb. 3. 10,5 ccm m/1 Phosphat (9,5 ccm sekund., 0,5 ccm prim. Phosphat. p_H etwa 8,0). Kurve I: Dioxyaceton $1,88 \cdot 10^{-5}$ Mole, etwa $1,8 \cdot 10^{-3}$ molar. Kurve II: Dioxyaceton $0,8 \cdot 10^{-5}$ Mole, etwa $0,7 \cdot 10^{-3}$ molar. Die Pfeile bezeichnen diejenigen O_2-Mengen, die zu der Dioxyacetonmenge in dem molaren Verhältnis 1,5 : 1 stehen.

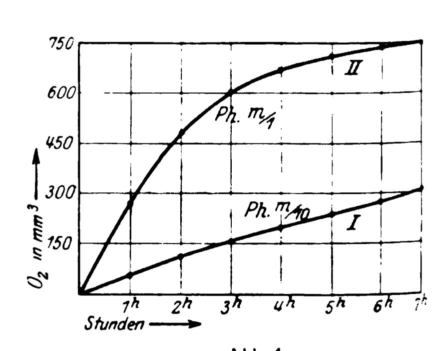


Abb. 4. Dioxyaceton $2,7 \cdot 10^{-5}$ Mole. Kurve I: 10,5 ccm m/10 Phosphat. Kurve II: 10,5 ccm m/1 Phosphat (9,5 ccm sekund., 0,5 ccm prim. p_H etwa 8,0).

mehr. Die größere Oxydationsgeschwindigkeit gibt die Möglichkeit, den Gesamtverbrauch von Sauerstoff zu messen. Nach 7 bis 8 Stunden ist (unter den gewählten Bedingungen) der Endwert nahezu erreicht

[1]) *O. Warburg* und *M. Yabusoe*, l. c.

(Abb. 3, Kurve I und II und Abb. 4, Kurve II) und ist das molare Verhältnis von Dioxyaceton zu verbrauchtem Sauerstoff etwa 1:1,5.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Durch die Wasserstoffionenkonzentration wird die Oxydation des Dioxyacetons in der gleichen Weise wie die der Fructose beeinflußt: zunehmende Alkaleszenz beschleunigt die Reaktion, doch ist hervorzuheben, daß die Oxydation auch noch bei einem p_H von 6,2 meßbar ist (Abb. 5).

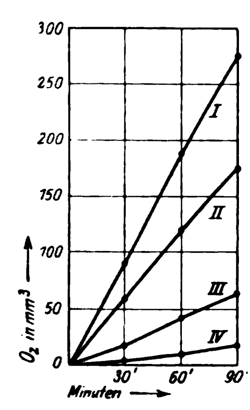


Abb. 5. Dioxyaceton 1,88 . 10^{-5} Mole, etwa 1,8 . 10^{-3} molar. 10,5 m/1 Phosphatlösung. Kurve I: 9,5 ccm sekund., 0,5 ccm prim., p_H etwa 8,0. Kurve II: 8,0 ccm sekund., 2,0 ccm prim., p_H etwa 7,4. Kurve III: 5,0 ccm sekund., 5,0 ccm prim., p_H etwa 6,8. Kurve IV: 2,0 ccm sekund., 8,0 ccm prim., p_H etwa 6,2.

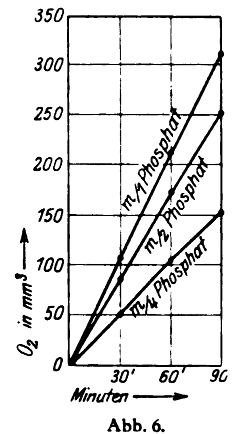


Abb. 6.
Dioxyaceton 4 . 10^{-5} Mole 10,5 ccm Phosphat (8 ccm sekund., 2 ccm prim., p_H etwa 7,4).

Einfluß der Phosphatkonzentration.

Wie bei der Fructose, nimmt mit steigender Phosphatkonzentration die Oxydationsgeschwindigkeit, wenn auch etwas langsamer, zu (Abb. 6). In m/10 Phosphatlösung ist die Geschwindigkeit noch erheblich (Abb. 4). Aus derselben Abbildung ist auch zu ersehen, daß Kurve I (m/10 Phosphatlösung) sich allmählich der Kurve II (m/1 Phosphatlösung) nähert. 3 Stunden nach Beginn der Reaktion ist das Verhältnis der verbrauchten Sauerstoffmenge 1:4, nach 7 Stunden 2:5. In wässeriger Lösung — ohne Phosphat — ist eine Verbrennung des Dioxyacetons (auch neutralisiert und mit Eisenzusatz) in den verwendeten Konzentrationen nicht zu beobachten.

Einfluß der Dioxyacetonkonzentration.

Die verbrauchte Sauerstoffmenge ist der Konzentration des Dioxyacetons proportional, der Endwert, pro Mol gerechnet, der gleiche (Abb. 1).

Kohlensäurebildung.

Bezüglich der Methodik der Bestimmung und der Berechnung sei auf die mehrfach zitierte Arbeit verwiesen[1]).

Über die Größenverhältnisse orientiert Tabelle I.

Pro Mol verbrauchten Sauerstoffs wird im Durchschnitt etwas mehr als 0,4 Mol Kohlensäure gebildet, doch scheint dieser Wert bei steigendem p_H und weiter vorgeschrittener Verbrennung (s. Rubrik 6) sich einem Endwert, der nicht weit von 0,5 liegt, zu nähern (vgl. auch Glycerinaldehyd).

3. Glycerinaldehyd.

Die Oxydationsgeschwindigkeit, die Gesamtmengen des verbrauchten Sauerstoffs und der gebildeten Kohlensäure sind mit denjenigen des Dioxyacetons nahezu identisch (s. Abb. 7 und Tabelle II).

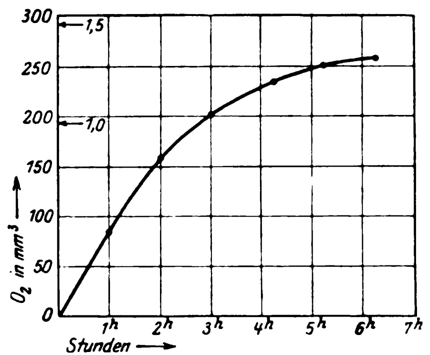


Abb. 7. Glycerinaldehyd 0,88 . 10^{-5} Mole = 1,6 . 10^{-3} molar. 5,5 ccm m/1 Phosphat (9,5 ccm sekund., 0,5 ccm prim., p_H etwa 8,0). Die Pfeile bezeichnen diejenigen O_2-Mengen, die zur Dioxyacetonmenge im molaren Verhältnis 1 : 1 und 1,5 : 1 stehen.

II. Beschleunigung der Oxydation durch Schwermetalle und ihre Hemmung durch KCN und $Na_4P_2O_7$.

1. Fructose.

Zur Untersuchung der Metallwirkung wurde das (eisenärmere) sekundäre Orthophosphat von dem ihm anhaftenden Eisen so weit gereinigt[2]), daß die Rhodanidprobe keine Färbung mehr gab, und wurde dann durch Zusatz von eisenfreier Salzsäure auf das

[1]) *O. Warburg* und *Yabusoe*, l. c.

[2]) Zu 1 Liter einer m/1 sekundären Phosphatlösung wurden 8,0 g NaOH und 50 ccm n/10 $CaCl_2$ zugesetzt, die Lösung erwärmt und vom Niederschlag abfiltriert.

Tabelle I. Kohlensäurebildung.

1	2	3	4	5	6
Zusammensetzung der Dioxyacetonlösung	Trog 1	Trog 2	Trog 3	$\frac{CO_2}{O_2}$	O_2-Verbr. in Proz. d. Ges.-O_2-Verbr.
Dioxyaceton 0,88 . 10^{-5} Mole 9,5 ccm sek., 0,5 ccm prim. m/1 Phosphat. p_H etwa 8,0.	Hauptraum: 3,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1 ccm KOH. $v_G = 24{,}5$. $v_F = 4{,}5$. $K_{O_2} = 2{,}16$. $h = -93{,}5$ mm (nach 255'). $x_{O_2} = -202$ cmm.	Hauptraum: 3,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}0$, $v_F = 5{,}0$. $K_{O_2} = 2{,}12$. $K_{CO_2} = 2{,}37$. $h = -92{,}5$ mm. $x_{CO_2} = 7$ cmm. Nach Einkippen der H_2SO_4: $H = 57$ mm $= 134$ cmm CO_2.	Hauptraum: 3,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 25$. $v_F = 5{,}0$. $K_{CO_2} = 2.44$. Nach Einkippen der H_2SO_4 zur Zeit t_0: $H = 23$ mm $= 56$ cmm CO_2.	$\frac{7 + 134 - 56}{202} = 0{,}42$	etwa 74 Proz.
Dioxyaceton 1,9 . 10^{-5} Mole. 8,5 ccm sek., 1,5 ccm prim. m/1 Phosphat. p_H etwa 7,5.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1 ccm KOH. $v_G = 26{,}3$. $v_F = 6{,}5$. $K_{O_2} = 2{,}32$. $h = -236$ mm (nach 420'). $x_{O_2} = -547$ cmm.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}9$. $v_F = 7{,}0$. $K_{O_2} = 2{,}2$. $K_{CO_2} = 2{,}53$. $h = -216$ mm. $x_{CO_2} = 82$ cmm. Nach Einkippen von H_2SO_4: $H = 92{,}5$ mm $= 233$ cmm CO_2.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}7$. $v_F = 7{,}0$. $K_{CO_2} = 2{,}52$. Nach Einkippen von H_2SO_4 zur Zeit t_0: $H = 24{,}5$ mm $= 62{,}5$ cmm CO_2.	$\frac{82 + 233 - 62}{547} = 0{,}46$	etwa 90 Proz.
Dioxyaceton 1,9 . 10^{-5} Mole. 8,5 ccm sek., 1,5 ccm prim. m/1 Phosphat. p_H etwa 7,5.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1 ccm KOH. $v_G = 26{,}3$. $v_F = 6{,}5$. $K_{O_2} = 2{,}32$. $h = -109$ mm (nach 180'). $x_{O_2} = -253$ cmm.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}9$. $v_F = 7{,}0$. $K_{O_2} = 2{,}2$. $K_{CO_2} = 2{,}53$. $h = -103$ mm. $x_{CO_2} = 39$ cmm. Nach Einkippen von H_2SO_4: $H = 55{,}5$ mm $= 140$ cmm CO_2.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}7$. $v_F = 7{,}0$. $K_{CO_2} = 2{,}52$. Nach Einkippen von H_2SO_4 zur Zeit t_0: $H = 28{,}5$ mm $= 72$ cmm CO_2.	$\frac{39 + 140 - 72}{253} = 0{,}42$	etwa 45 Proz.
Dioxyaceton 1,3 . 10^{-4} Mol. 3,0 ccm sek., 7,0 ccm prim. m/1 Phosphat. p_H etwa 6,5.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1 ccm KOH. $v_G = 25{,}4$. $vF = 6{,}5$. $K_{O_2} = 2{,}24$. $h = -255$ mm (nach 195'). $x_{O_2} = -571$ cmm.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 25{,}8$. $v_F = 7{,}0$. $K_{O_2} = 2{,}28$. $K_{CO_2} = 2{,}61$. $h = -201$ mm. $x_{CO_2} = 129$ cmm. Nach Einkippen von H_2SO_4: $H = 9{,}5$ mm $= 26$ cmm CO_2.	Hauptraum: 5,5 ccm D.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 24{,}7$. $v_F = 7{,}0$. Nach Einkippen von H_2SO_4 zur Zeit t_0: $H = 0$.	$\frac{129 + 26}{571} = 0{,}27$	etwa 13 Proz.

Erläuterungen zur Tabelle: x_{O_2} = Sauerstoffverbrauch. Rubrik 3: x_{CO_2} = die an den Gasraum abgegebene Kohlensäure. CO_2 = die zu Ende des Versuchs in der Lösung vorhandene Kohlensäure. Rubrik 4: CO_2 = die zu Beginn des Versuchs in der Lösung vorhandene Kohlensäure. Die gesamte gebildete Kohlensäure ist demnach gleich: x_{CO_2} + CO_2 (Rubrik 3) — CO_2 (Rubrik 4).

Tabelle II. Kohlensäurebildung.

1	2	3	4	5	6
Zusammensetzung der Lösung	Trog 1	Trog 2	Trog 3	$\frac{CO_2}{O_2}$	O_2-Verbr. in Proz. des Endwertes
Glycerinaldehyd 0,87 . 10^{-5} Mol. 9,5 ccm sek., 0,5 ccm prim. m/1 Phosphat. p_H etwa 8,0	Hauptraum: 3,5 ccm Gl.-Lösung. Einsatz: 1,0 ccm KOH. $v_G = 24{,}5$. $v_F = 4{,}5$. $K_{O_2} = 2{,}16$. $h = -100$ mm (nach 330′) $x_{O_2} = -216$ cmm.	Hauptraum: 3,5 ccm Gl.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 22$. $v_F = 5{,}0$. $K_{O_2} = 1{,}94$. $K_{CO_2} = 2{,}18$. $h = -101$ mm. $x_{CO_2} = 22$ cmm. Nach Einkippen von H_2SO_4. $H = 68$ mm = 148 cmm CO_2.	Hauptraum: 3,5 ccm Gl.-Lösung. Einsatz: 1,5 ccm 5fach n H_2SO_4. $v_G = 25$. $v_F = 5{,}0$. $K_{CO_2} = 2{,}44$. Nach Einkippen von H_2SO_4 zur Zeit t_0: $H = 26$ mm = 63 cmm CO_2.	$\frac{22 + 148 - 63}{216} = 0{,}49$	85 bis 95 Proz.

gewünschte p_H gebracht. Der Vergleich des Verhaltens der Fructose in ungereinigter und gereinigter Phosphatlösung ergab aber keinen nennenswerten Unterschied, was wohl auf den relativ hohen Gehalt der Fructose an metallischen Verunreinigungen zurückzuführen ist (vgl. auch unter Dioxyaceton).

Ferner wurde, wie schon eingangs erwähnt, die Reihenfolge bei der Zusammensetzung des Systems berücksichtigt.

In einem Reaktionsgebiet von $p_H = 7{,}4$ bis 7,7 zeigen Cu, aber auch Fe noch eine, wenn auch nicht erhebliche, Beschleunigung (Co, Ni, Zn, Sn und Pb wirken etwas hemmend). Siehe Tabelle III und IV.

Tabelle III.

Zeit	4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat. p_H etwa 7,4	
	ohne Zusatz	Cu 1 . 10^{-3} mol.
20′	31 cmm O_2	39 cmm O_2
40	63 „ „	83 „ „
60	102 „ „	128 „ „

Beschleunigung d. Oxydation 25 Proz.

Tabelle IV.

Zeit	4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat. p_H = 8,0 bis (8,3)	
	ohne Fe	Fe 1 . 10^{-3} mol.
20′	43 cmm O_2	58 cmm O_2
40	89 „ „	122 „ „
60	136 „ „	187 „ „

Beschleunigung d. Oxydation 40 Proz.

Zeit	4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat p_H = 7,4 bis (7,7)	
	ohne Fe	Fe 1 . 10^{-3} mol.
20′	33 cmm O_2	40 cmm O_2
40	71 „ „	90 „ „
60	106 „ „	135 „ „

Beschleunigung d. Oxydation 28 Proz.

Die Wirkung von KCN und $Na_4P_2O_7$ auf die Oxydation der Fructose und die

Aufhebung der durch Cu-Zusatz hervorgerufenen Beschleunigung veranschaulichen die Abb. 8 und 9.

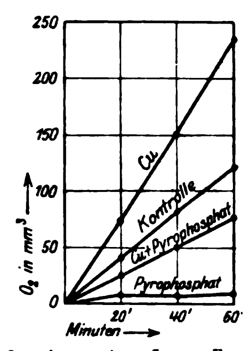


Abb. 8. 4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat. p_H = 7,7 bis 8,0. Cu 1 . 1^{-4} mol. $Na_4P_2O_7$ 1 . 10^{-2} mol (vor Zusatz neutralisiert).

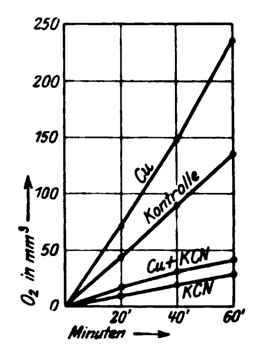


Abb. 9. 4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat. p_H = 7,7 bis 8,0. 1 . 10^{-4} mol. Cu. 1 . 10^{-2} mol. KCN.

Anders liegen die Verhältnisse bei der Kombination von Eisen und Natriumpyrophosphat, die die Oxydation bedeutend stärker beschleunigt

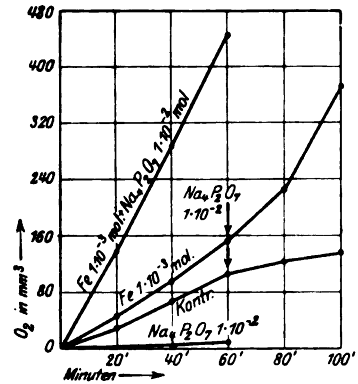


Abb. 10. 4 ccm einer 5 proz. Fructoselösung in m/2 Phosphat. p_H = 7,7 bis 8,0. Pfeil: Einkippen des Pyrophosphats.

als das Eisen allein (Abb. 10). Auch in einer schwach alkalischen, *wässerigen* Lösung — ohne Orthophosphat — wird Fructose in Gegenwart von Eisenpyrophosphat oxydiert (Tabelle V).

Tabelle V.

Zeit	4 ccm einer 5proz. Fructoselösung	4 ccm einer 5proz. Fructoselösung. Fe 1 . 10^{-3} mol. $Na_4P_2O_7$ 5 . 10^{-3} mol.			
	in m/2 Phosphat p_H etwa 8,0	in m/2 Phosphat p_H 8,0 bis 8,2	in m/2 Phosphat. Pyrophosph. vor Zusatz neutral p_H etwa 8,0	in Wasser p_H 8,6 bis 8,9	in Wasser p_H etwa 8
20'	32 cmm O_2	120 cmm O_2	86 cmm O_2	63 cmm O_2	1,5 cmm O_2
40	63 „ „	248 „ „	184 „ „	114 „ „	3,0 „ „

Offenbar wird diese Tatsache durch eine Arbeit von *H. A. Spöhr*[1]) verständlich.

Spöhr untersuchte nämlich die Oxydation von Kohlehydraten und fand, daß z. B. Glucose, Fructose und andere Zucker in Lösungen von Natrium-Ferropyrophosphat [nach *Pascal*[2]) von der Zusammensetzung $Na_8Fe_2(P_2O_7)_3$] und Orthophosphat an der Luft oxydiert werden.

Während also im allgemeinen die durch Metalle hervorgerufene Beschleunigung der Oxydation durch Zusatz von Komplexbildnern aufgehoben wird [es gilt das ja nicht nur für Fructose, sondern auch für eine Reihe anderer oxydativer Vorgänge, z. B. die Oxydation des Cysteins[3])], handelt es sich hier um eine spezifische katalytische Wirkung des Eisenpyrophosphats.

Eine Hemmung durch Zusatz von Komplexbildnern tritt eben nur dann ein, wenn die entsprechende komplexe Metallverbindung ihrerseits katalytisch unwirksam ist.

Einen der Eisenpyrophosphatwirkung ähnlichen Fall hat *E. Negelein*, wie er mir mitzuteilen erlaubt, bei Untersuchung der Wasserstoffperoxydkatalyse gefunden. Eisen- und Mangan beschleunigen den Zerfall von H_2O_2 in alkalischer Lösung. Pyrophosphat bringt die Wirkung beider Metalle zum Verschwinden, Blausäure jedoch nur die Wirkung von Eisen; die Wirkung des Mangans wird durch Blausäure nicht nur nicht gehemmt, sondern sogar verstärkt, und zwar deshalb, weil die komplexe Mangan-Blausäureverbindung Wasserstoffperoxyd katalytisch spaltet.

2. *Dioxyaceton.*

Die Wirkungen der Metalle und der Komplexbildner sind im wesentlichen die gleichen wie bei der Fructose. Zu bemerken ist ein größerer Unterschied bei Benutzung der gewöhnlichen und gereinigten Phosphatlösungen: in letzterer verläuft die Oxydation langsamer, der Einfluß der Metalle macht sich stärker geltend.

In neutraler Lösung, bei $p_H = 7{,}4$ bis $7{,}7$ ist die Wirkung der Metalle und Komplexbildner noch beträchtlich (s. Tabelle VI und VII). In Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-3}$ mol. erhöht $Cu^{\cdot\cdot}$ die Oxydation

---

[1]) *H. A. Spöhr*, Journ. of Amer. Chem. Soc. V, **46**, Nr. 6, 1924.

[2]) *Pascal*, Ann. chim. [8] **16**, 386, 1909.

[3]) *O. Warburg* und *S. Sakuma*, Über die sogenannte Autoxydation des Cysteins, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **200**, 203, 1923; *S. Sakuma*, diese Zeitschr. **142**, 68, 1923; *O. Warburg* und *W. Brefeld*, Aktivierung stickstoffhaltiger Kohle durch Eisen, ebendaselbst **145**, 461, 1924; *O. Warburg*, Über die antikatalytische Wirkung der Blausäure, ebendaselbst **136**, 266, 1923.

Tabelle VI.

Zeit	5,5 ccm einer $1 . 10^{-2}$ mol. Dioxyacetonlösung in m/1 Phosphat. $p_H = 7,4$ bis (7,7)			
	ohne Zusatz	Fe $1 . 10^{-4}$ mol.	Mn $1 . 10^{-4}$ mol.	Cu $1 . 10^{-4}$ mol.
20′	105 cmm O_2	147 cmm O_2	156 cmm O_2	238 cmm O_2
40′	213 „ „	291 „ „	310 „ „	460 „ „
Beschleunig. d. Oxydation		36 Proz.	44 Proz.	115 Proz.

Tabelle VII.

Zeit	5 ccm einer $0,93 . 10^{-2}$ mol. Dioxyacetonlösung in m/1 Phosphat. $p_H = 7,4$		
	ohne Zusatz	$Na_4P_2O_7$ $1 . 10^{-3}$ mol.	$Na_4P_2O_7$ $1 . 10^{-4}$ mol.
20′	68 cmm O_2	20 cmm O_2	51 cmm O_2
40′	134 „ „	41 „ „	103 „ „
Hemmung der Oxydation		70 Proz.	23 Proz.

um 125 Proz., Fe¨ um 61 Proz., Mn um 63 Proz., KCN hemmt in $1 . 10^{-3}$ mol. Konzentration bei p_H etwa 8 um 40 Proz. Auch hier

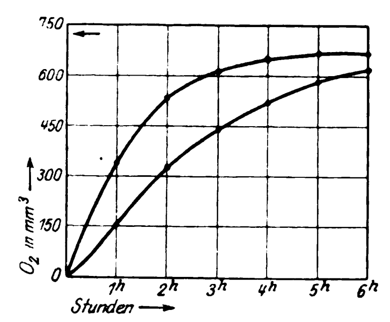


Abb. 11. 10,5 ccm m/1 Phosphat (p_H etwa 8,3). Dioxyaceton $2,2 . 10^{-5}$ Mole $= 2 . 10^{-3}$ mol. Cu $= 1 . 10^{-4}$ molar. Pfeil bezeichnet diejenige O_2-Menge, die zur Dioxyacetonmenge im molaren Verhältnis 1,5 : 1 steht. Untere Kurve ohne Cu, obere Kurve mit Cu.

beschleunigt also Kupfer am meisten. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration macht sich in gleicher Richtung wie bei der Fructose geltend.

Von Interesse war schließlich die Frage, ob die Oxydation bei Zusatz von Metallen nicht nur schneller, sondern auch vollständiger verlaufe. Aus Abb. 11 ist zu ersehen, daß dieses nicht der Fall ist.

Ein neues Potentiometer.

Von

Ernst Mislowitzer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I. Es hat den Anschein, als ob die auffallende Zurückhaltung, die in vielen biochemischen und medizinischen Laboratorien gegenüber der Gaskettenmethode besteht, in der etwas schwierigen Bedienung der zugehörigen Apparatur begründet ist. Läßt sich die eigentliche Messung immerhin noch ziemlich bald erlernen, so gehört schon weit mehr Erfahrung dazu, die immer wieder auftretenden Störungen zu beheben. Die vielen offen liegenden Kontakte und Leitungen, die Stromschlüssel und vor allem das Kapillarelektrometer erfordern eine ständige Überwachung und Pflege. Da es hieran meistens gebricht und sich daher gewisse Schwierigkeiten allmählich einstellen und schließlich anhäufen, ist es erklärlich, daß diese ganze Apparatur von nicht physikalisch geschulten Untersuchern oft ungern benutzt wird.

Das ist um so beklagenswerter, als die Forschung der letzten Jahre in der elektrometrischen Titration ein ganz neues Gebiet erschlossen und ausgebaut hat, das auch von der Analytik in der Biochemie nicht übersehen werden darf.

Wir stellten uns nun die Aufgabe, ein Potentiometer zu konstruieren, dessen Bedienung leicht, und dessen Störungsmöglichkeit äußerst klein ist.

Mit der Fertigstellung des nun zur Beschreibung gelangenden Apparates glauben wir, dieser Aufgabe genügt zu haben.

Wenn wir uns auch in der äußeren Form an die erprobten amerikanischen Modelle gehalten haben, so ist doch in der Benutzung *nur eines* Meßinstrumentes eine grundsätzliche, vereinfachende Abweichung diesen gegenüber vorhanden.

II. Die ursprüngliche *Poggendorff*sche Kompensationsmethode wird eingehalten. An Stelle des Meßdrahts bzw. des Rheostatenkastens kommt hier eine Kombination von einem zirkulär aufgelegten Meßdraht und dekadischen Widerständen zur Anwendung.

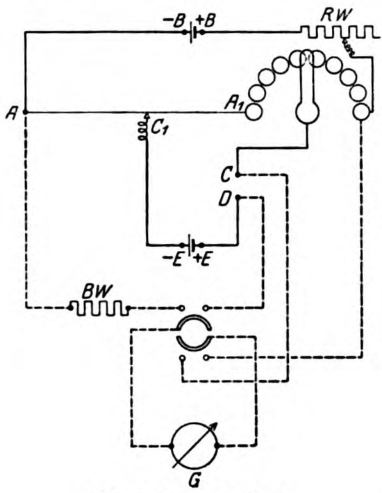


Abb. 1. Leitungsschema.

Die an beiden Enden des Gesamtwiderstandes angelegte Hilfsspannung wird direkt gemessen. Sie wird durch einen Vorschaltwiderstand genau auf 1100 Millivolt gebracht. Da der Gesamtwiderstand in 1100 Teile unterteilt ist, entspricht ein Teil einem Millivolt, die Brückenzahlen bedeuten also zugleich Millivolts. Zum Messen und Einstellen der Hilfsspannung dient ein Präzisionsvoltmeter. Dasselbe Instrument wird durch Betätigung des Voltmeterumschalters von den beiden Enden des Gesamtwiderstandes abgeschaltet und in den Teilstromkreis gelegt, wo es dann als hochempfindliches Galvanoskop die Nullstellung anzeigt.

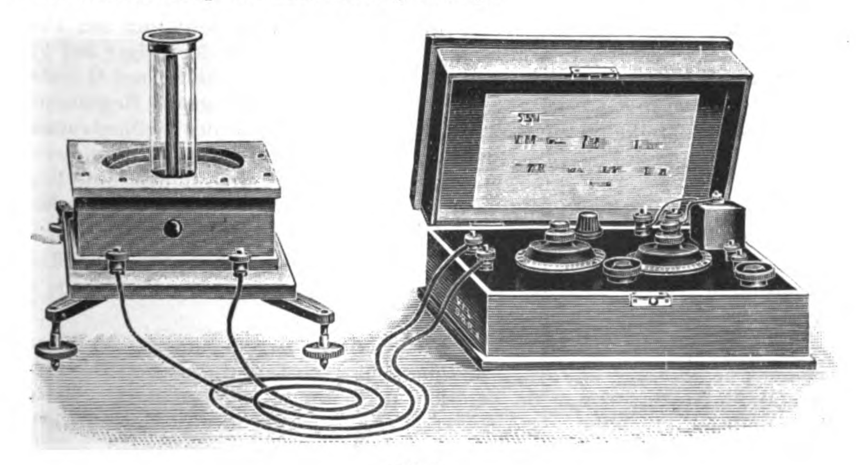


Abb. 2.

III. Die ganze Apparatur besteht aus zwei Teilen, und zwar aus einem *Kasten*, dem eigentlichen Kompensationskasten, und aus dem *Meßinstrument*. Diese Zweiteilung gestattet, das hochempfindliche Meßinstrument auch *gesondert von der Gesamtapparatur* zu verwenden.

Der Kasten ist 34 cm lang, 21 cm breit und 12,5 cm hoch; er besteht aus einem Unterteil und einem hochklappbaren Deckel.

Wird der Deckel aufgestellt, so sieht man das Innere des Unterteils durch eine schwarz polierte Schaltplatte verschlossen, welche nur von einigen Drehknöpfen und Kontakten, die aus Hartgummi sind, durchsetzt ist.

Rechts und links von der Mitte dieser Platte liegen die beiden Skalendrehknöpfe.

Der linke Skalendrehknopf (vom Beschauer aus gesehen) steht in der Mitte einer kreisförmigen Skala, die von 0 bis 100 in 100 Teile unterteilt ist, während die Skala des rechten Knopfes zehn Schritte von je 100 Teilen anzeigt, die mit 100, 200, 300 usw. bis 1000 bezeichnet sind. Außer diesen beiden Skalendrehknöpfen sind noch drei weitere Drehknöpfe vorhanden. Der eine läßt sich von *V* nach *G* bzw. von *P* nach *M* bewegen, wodurch das Voltmeter zu einem Galvanometer als Nullinstrument wird. Der zweite, rechts von diesem gelegen, stellt einen Unterbrecher im Nebenstromkreis dar und ermöglicht ein schnelles Ein- und Ausschalten unter Zwischenschaltung einer Schutzvorrichtung. Der letzte Drehknopf, der hinter den beiden Skalendrehknöpfen liegt, dient zur Regulierung der angelegten Vergleichsspannung.

Außer diesen Drehknöpfen sind noch die erforderlichen Anschlußkontakte auf der Schaltplatte angebracht. Zwei nicht verwechselbare gehören zur Hilfsbatterie, zwei weitere für die zu untersuchende Spannung; diese Kontakte liegen am rechten Rand der Schaltplatte. Die letzten beiden liegen am linken Rand und führen zum Meßinstrument. Alle Kontakte und Klemmen sind bezüglich bezeichnet. Das Meßinstrument ist ein hochempfindliches Fadengalvanometer; es ist mit Holz umkleidet. Die Skala zeigt den Nullpunkt an, ferner eine Marke bei 1100.

IV. Zur Ausführung einer Messung wird zunächst das Meßinstrument die zu untersuchende Kette und die Hilfsbatterie mit dem Kompensationskasten verbunden, der Voltmeterumschalter auf *V* gestellt und der Drehknopf des Vorschaltwiderstandes so lange reguliert, bis der Zeiger auf 1100 zeigt (Lupeneinstellung). Dann wird der Volmeterumschalter auf *G* gestellt und durch Betätigung des rechten Skalendrehknopfes (grobe Regulierung) die ungefähre Nullstellung gesucht. Schlägt der Zeiger des Meßinstruments z. B. bei 300 nach links, bei 400 nach rechts, so wird die grobe Regulierung wieder auf 300 gestellt und mit dem linken Skalendrehknopf (feine Regulierung) die wirkliche Nullstellung aufgesucht. Bei einiger Übung ist dieser Punkt und somit die Spannung der Kette in 1 bis 2 Minuten gefunden.

V. Ein Westonelement oder ein Cadmiumnormalelement ist bei dieser Anordnung unnötig. Wenn es vorhanden ist, kann es zur Kontrolle der Voltmetereinstellung dienen.

VI. Es ist streng darauf zu achten, daß die Arretierung des Meßinstruments nur *nach der Libelleneinstellung* gelöst wird, und daß eine Bewegung des Meßinstruments nur im arretierten Zustande erfolgen darf. Bei der hohen Empfindlichkeit des Meßinstruments können in der Nähe des Nullpunkts Stromausschläge durch Erschütterungen vorgetäuscht werden. Daher soll das Meßinstrument möglichst erschütterungsfrei aufgestellt

werden. Für die allerfeinste Einstellung ist die mitgegebene Lupenablesung zweckmäßig.

VII. Die Widerstände sind auf 1 Promille genau geeicht. In der gleichen Größenordnung liegt daher auch der unvermeidliche, durchschnittliche Fehler. Der Maximalfehler kann im ungünstigsten Falle das Doppelte betragen.

Das Galvanometer gestattet, bei einiger Übung noch Potentialdifferenzen zu erkennen, die erheblich unter einem Millivolt liegen, die Einstellung des Nullpunktes ist daher mindestens auf 0,6 bis 0,7 Millivolt möglich. — Vergleichende Potentialmessungen mit der älteren Apparatur und mit diesem Potentiometer, die seit einigen Monaten angestellt wurden, ergaben stets innerhalb der Fehlerbreite vollständige Übereinstimmung der Werte.

Dieses Potentiometer[1]) wird von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N 39, Scharnhorststraße, geliefert.

Herr *Goldschmidt*, Inhaber der Firma Gans und Goldschmidt, Elektrizitäts-G. m. b. H., Berlin, hat mich bei der Ausarbeitung dieser Konstruktion erheblich unterstützt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle bestens danke.

---

[1]) D. R.-P. angemeldet.

Zur H-Ionenmessung mit Chinhydron. Eine neue Doppelelektrode in Becherglasform.

Von

Ernst Mislowitzer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I. *Biilmann*[1]) hat im Jahre 1921 gezeigt, daß zur Messung von Wasserstoffionenkonzentrationen die gewöhnliche Wasserstoffelektrode durch eine Chinhydronelektrode ersetzt werden kann. Das Chinhydron ruft in wässeriger Lösung einen konstanten, wenn auch sehr schwachen Wasserstoffdruck hervor. Gegenüber einer Wasserstoffelektrode mit einem Wasserstoffdruck von 1 Atm. hat eine Chinhydronelektrode ein Potential von 0,7044 Volt bei 18^0. Ihr Wasserstoffdruck wurde zu etwa 10^{-24} Atm. berechnet.

Biilmann und *Lund*[2]) und dann auch *Sörensen*[3]) haben sehr bald noch weitere Untersuchungen über die Chinhydronelektrode mitgeteilt und erneut auf die Vorzüge einer solchen hingewiesen.

War so die Brauchbarkeit dieser neuen Elektrode als *Ableitungselektrode* gesichert, so konnte sehr bald die Möglichkeit gezeigt werden, auch als *Bezugselektrode* eine Chinhydronelektrode anzuwenden. *Veibel*[4]) unterzog sich im Auftrage von *Biilmann* der Aufgabe, eine derartige Bezugselektrode aufzufinden und zu prüfen und konnte schon im Jahre 1923 über seine durchaus gelungenen Versuche berichten. Von diesem Zeitpunkt an wurde in verschiedenen Laboratorien mit einer sogenannten Chinhydronkette gemessen.

Von weiteren Arbeiten, die sich mit der Chinhydronelektrode, sei es der einfachen oder der doppelten, beschäftigen, soll vor allem

---

[1]) Ann. de Chim. **15**. Paris 1921.
[2]) Ebendaselbst **16**. Paris 1921.
[3]) C. r. des Trav. du Laborat. Carlsberg **14**, Nr. 14, 1921.
[4]) Trans. of the Chem. Society **123**, 1923.

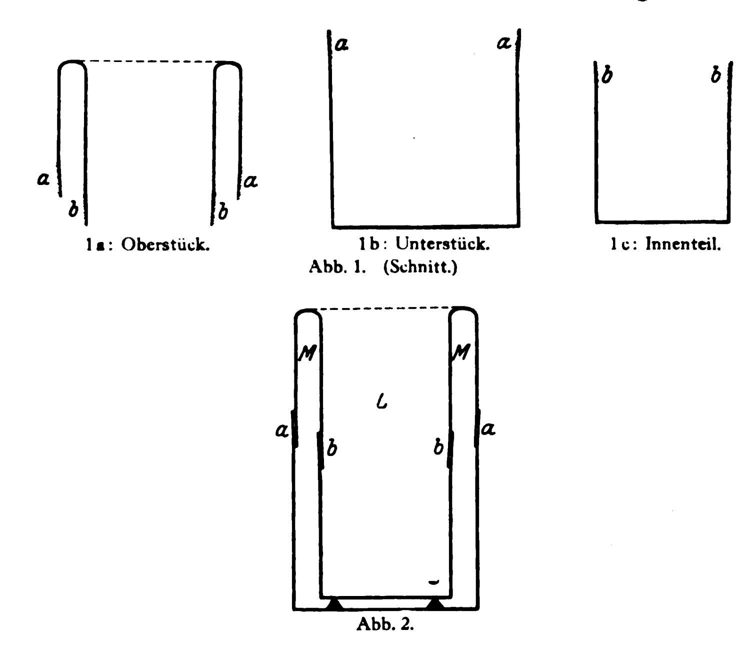
die von *F. Auerbach*[1]) genannt werden, dann auch eine weitere von *M. Trénel*[2]) und die jüngste von *Schaefer* und *Schmidt*[3]).

Alle diese Arbeiten lassen die große Bequemlichkeit der H-Ionenmessung mit Chinhydron erkennen. Da das Einleiten von Wasserstoff fortfällt und sich das endgültige Potential fast augenblicklich einstellt, dauert eine Messung nur allerkürzeste Zeit.

II. Während für die Benutzung von atmosphärischem Wasserstoff in der Birnen- und in der U-Elektrode und auch in zahlreichen anderen eine allen Anforderungen genügende Apparatur vorhanden ist, sind die Einrichtungen für die Chinhydronkette bisher mehr oder weniger behelfsmäßig. Im folgenden teilen wir eine neue Anordnung mit, die sich bei uns als besonders praktisch erwiesen hat.

Das neue Elektrodengefäß stellt eine Doppelelektrode dar, da die *Bezugs*- und die *Ableitungs*elektrode in *einem Gefäß* vereinigt sind.

Die Zwischenschaltung von Hebern, Wollfäden, Agarhebern Glaswannen usw. kommt in Fortfall. Die Verbindung der beiden



1a: Oberstück. 1b: Unterstück. 1c: Innenteil.
Abb. 1. (Schnitt.)

Abb. 2.

Elektrodenflüssigkeiten geschieht *einzig und allein* durch einen zweckmäßig angebrachten *Glasschliff*. Die äußere Form ähnelt der eines Becherglases mit doppelter Wandung.

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **110**, 1924.

[2]) Zeitschr. f. Elektrochem. **30**, 1924.

[3]) Diese Zeitschr. **156**, 1925.

III. Das ganze Gefäß besteht aus drei Hauptteilen, einem *Ober*stück, einem *Unter*stück und einem *Innenteil*.

Das *Ober*stück ist aus einem äußeren und inneren Zylinder hergestellt, die an ihren oberen Rändern ineinander übergehen.

Das *Unter*stück und das *Innenteil* haben die Form von einfachen Bechern, und zwar paßt das *Unter*stück auf den Schliff *a* des Außenzylinders vom *Ober*stück und das *Innenteil* auf den Schliff *b* des *Ober*stücks.

Abb. 2 zeigt alle drei Teile zusammengesetzt, ebenfalls im Schnitt.

Durch diese Anordnung wird ein Mantelraum *m* und ein Lumen *L* ermöglicht, die durch *den Schliff b miteinander in Verbindung stehen.*

Der Mantelraum *m* enthält schließlich noch einen eingeschliffenen Glasstab mit einer Platinelektrode.

Das Lumen *L* wird bei den größeren Modellen von einem Glasdeckel verschlossen, der eine Platinelektrode und ein Thermometer trägt.

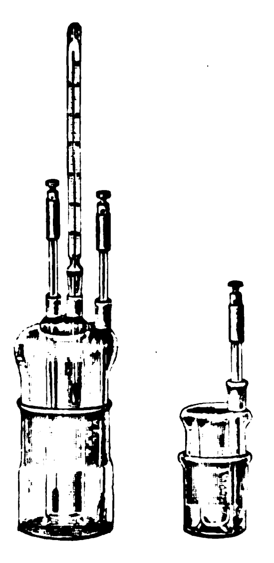


Abb. 3.

Abb. 3 zeigt das vollständige Elektrodengefäß (großes und kleines Modell).

IV. Als Bezugselektrode kann *jede Lösung* von einer *bestimmten Acidität* dienen. Sie wird mit Chinhydron versetzt und kurz geschüttelt. Zweckmäßig ist z. B. ein Gemisch einer Standardacetatlösung (nach *L. Michaelis*) und einer gesättigten KCl-Lösung zu gleichen Teilen. Durch den Salzzusatz kommen durch Beeinflussung der Chinhydronkomponenten geringe Potentialabweichungen vor, siehe *Sörensen*[1]). Diese lassen sich entweder mit Hilfe der Korrektionsformel von *Sörensen* berechnen oder direkt mit Hilfe einer Kalomelbezugselektrode messen. Die gemessene Potentialdifferenz wird dann zu dem Werte Chinhydron-Kalomel [siehe *J. Auerbach* l. c., S. 102] hinzuaddiert. Die erhaltene Summe ist das Potential dieser Elektrode gegenüber Wasserstoff.

V. Wie schon erwähnt, geschieht die Verbindung zwischen der Bezugselektrode im Mantelraum und der Ableitungselektrode im Lumen durch den Glasschliff *b* (s. Abb. 2). Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, diesen Glasschliff mit gesättigter KCl-Lösung zu füllen. Zu diesem Zwecke wird das gesonderte Innenteil bis zum oberen Rand mit dieser Lösung angefüllt und dann erst auf den Schliff *b* des Oberteiles fest aufgesetzt. Hierbei tritt KCl in die kapillären Spalten des Schliffes ein.

VI. Zum Einfüllen der Mantelelektrode gießt man die mit Chinhydron versetzte Elektrodenflüssigkeit in das *Unter*stück und füllt bis zum Rande auf. Setzt man nunmehr vorsichtig das *Ober*stück, an dem zu diesem Zeitpunkt bereits das *Innenteil* hängt, auf das *Unter*stück auf, so tritt die Elektrodenflüssigkeit in dem Mantelraum in die Höhe. Es genügt völlig, wenn die Flüssigkeit über den Schliff *b* reicht.

[1]) l. c.

VII. In das Lumen kommt die mit Chinhydron versetzte Untersuchungsflüssigkeit und eine Platinelektrode.

Je nach der Acidität dieser Lösung wird außen oder innen positiv geschaltet.

Nach beendeter Messung wird das ganze Gefäß wie ein Becherglas behandelt. Das Lumen wird entleert, ausgespült und zur nächsten Messung neu gefüllt. Die Mantelflüssigkeit wird durch diese Maßnahmen nicht berührt. So lassen sich in kürzester Zeit zahlreiche Messungen mit derselben Bezugselektrode ausführen.

VIII. Die Mantelflüssigkeit kann aus einer großen Vorratsflasche einmal am Tage eingefüllt werden und dient dann für alle Messungen des Tages.

Sie braucht aber 8 bis 14 Tage nicht erneuert zu werden, wenn man ihre Potentialänderungen berücksichtigt.

Die Elektrode wird täglich um etwa 1 Millivolt unedler, ein Wert, der aber mit einer anderen Bezugselektrode kontrolliert werden muß.

Zum Schluß teilen wir einige Zahlen mit:

I. Mantelflüssigkeit — ges. Kalomelelektrode.

1. Tag	180 Millivolt
6. „	179 „
10. „	177 „
14. „	175 „

Bei dieser Elektrode war die Abnahme, wie ersichtlich, recht gering.

II. Mantelflüssigkeit — ges. Kalomelelektrode.

28. I.	185,5 Millivolt
29. I.	185,5 „
30. I.	184,0 „
31. I.	182,0 „
2. II.	178,0 „
3. II.	176,0 „
4. II.	174,0 „
5. II.	173,0 „
7. II.	171,0 „

Die Messungen wurden sämtlich mit dem neuen Potentiometer (vgl. S. 68) ausgeführt.

Zahlreiche vergleichende Untersuchungen zeigten eine einwandfreie Übereinstimmung zwischen den Werten, die mit Wasserstoffelektroden erhalten wurden, und denen, die sich unter Benutzung des neuen Elektrodengefäßes messen ließen. Z. B.:

1. Phosphatlösung:
   - Doppelchinhydronelektrode . . . . p_H 8,38
   - H_2-Elektrode . . . . p_H 8.40

2. Phosphatlösung:
   Doppelchinhydronelektrode . . . . . . p_H 8,36
   H_2-Elektrode . . . . p_H 8,36
3. HCl-Lösung:
   Doppelchinhydronelektrode . . . . p_H 3,43
   H_2-Elektrode . . . . p_H 3,44
4. HCl-Lösung:
   Doppelchinhydronelektrode . . . . p_H 2,09
   H_2-Elektrode . . . . p_H 2,07
5. Essigsäure (theoretischer Wert p_H 2,87):
   Doppelchinhydronelektrode . . . . p_H 2,89
6. HCl:
   Doppelchinhydronelektrode . . . . p_H 1,10
   H_2-Elektrode . . . . p_H 1,09

Das neue Elektrodengefäß[1]) ist von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N 39, Scharnhorststraße, zu beziehen.

---

[1]) D. R.-P. angemeldet.

Zur H-Ionenmessung von Blut.
Die Spritze als Ableitungselektrode.

Von

Ernst Mislowitzer.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Vor wenigen Monaten veröffentlichten *Corran* und *Lewis*[1]) einige Messungen der Wasserstoffionenkonzentration vom Blut gesunder Männer und Krebskranker.

Während bis dahin alle p_H-Bestimmungen im Blute entweder mit der Indikatorenmethode oder mit Hilfe von Wasserstoffelektroden ausgeführt worden waren, bedienten diese Autoren sich einer Chinhydronelektrode.

Da die Indikatorenmethode nur im Blutplasma anwendbar ist und Ungenauigkeiten schon im Hinblick auf die notwendige Trennung des Plasmas von den roten Blutkörperchen möglich sind, war zu sorgfältigen Messungen wohl stets die potentiometrische Methode mit der Wasserstoffelektrode angewandt worden. Zur Ausführung dieser Methode sind gewisse Vorbereitungen nötig, die das Abdunsten der Kohlensäure verhindern und die notwendige Wasserstoffatmosphäre ermöglichen sollen. Besonders lästig ist bei dieser Methode die langsame Einstellung des Potentials, die eine halbe Stunde und bisweilen noch längere Zeit erfordert. Dies alles ließ die Einführung der Chinhydronmethode wünschenswert erscheinen.

Solange *Corran* und *Lewis* mit Platinelektroden arbeiteten, konnten sie zu keinem Resultat kommen. Erst als sie das Elektrodenmetall änderten [in Anlehnung an Versuche von *Dixon* und *Quastel*[2])] und das Platin durch Gold ersetzten, waren die Schwierigkeiten beseitigt.

---

[1]) *J. W. Corran* and *W. C. Milullagh Lewis*, Biochem. Journ. 18, Nr. 6, 1924.

[2]) *Dixon* und *Quastel*, Journ. Chem. Soc. **123**, 2943, 1923.

II. Um das Abdunsten der Kohlensäure ganz sicher zu vermeiden und die Methodik noch weiter zu vereinfachen, haben wir die Spritze, mit der das Blut aus der Vene entnommen wird, in ein Elektrodengefäß verwandelt. Zu diesem Zwecke wurde in eine Glasspritze eine Goldelektrode eingeschmolzen und eine leitende Verbindung zu einer außerhalb der Spritze angebrachten Polklemme hergestellt.

Abb. 1.

III. Zu Beginn einer Messung wird in die Spritze ein wenig Ringerlösung eingefüllt (etwa 0,5 ccm) und dazu etwas Chinhydron gegeben.

Dann werden, wie üblich, 1 bis 2 ccm Blut eingesaugt und diese durch einigemal wiederholtes Umkippen der Spritze mit der Ringerlösung und dem Chinhydron durchmischt.

Das Potential hat sich nach wenigen Sekunden eingestellt und kann sogleich gemessen werden, wobei die Spritze als Ableitungselektrode gegenüber einer beliebigen Bezugselektrode zu verwenden ist. Die Messung ist noch vor der Gerinnung des Blutes beendet.

Die Goldelektrode ist empfindlicher als die Platinelektrode. Sie muß vor jedesmaligem Gebrauch gründlich mit Bichromatschwefelsäure gereinigt und dann mit ausgekochtem destillierten Wasser gespült werden. Es ist notwendig, die Spritze vor jeder Messung mit Standardacetat zu prüfen. Einige Ergebnisse unserer Blutmessungen seien mitgeteilt:

		U-Elektrode	Spritze
1.	p_H	7,33	7,35
2.	p_H	7,42	7,43
3.	p_H	7,48	7,44

IV. Für die Messung von anderen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Transsudaten, ist die Goldelektrode besser durch eine Platinelektrode zu ersetzen, die weit einfacher zu bedienen ist.

Bei Leber-, Milzbrei usw. ist die Chinhydronmessung bisweilen gestört. Hier erscheint die Goldelektrode wieder vorteilhafter.

V. Eine 1-ccm-Elektrodenspritze fand bei uns nebenher Anwendung als Mikroelektrode, da sich in dieser Spritze schon 0,1 bis 0,2 ccm messen ließen (Kammerwasser).

VI. Bei dem Vergleich von Gold- und Platinelektroden stellten wir auch Untersuchungen mit ungepufferten Lösungen an.

Die Birnenelektrode kommt für die Messung von ungepufferten oder vorwiegend mit Carbonat gepufferten Lösungen nicht in Frage.

Dagegen ist die U-Elektrode hierzu durchaus geeignet. Sie muß vor Messungen dieser Art längere Zeit (bis zu 15 Minuten) platiniert werden.

Die Ergebnisse mit der U-Elektrode sind genauer als die der Indikatorenmethode.

Die Platinchinhydronelektrode ist bei diesen Lösungen einer Goldchinhydronelektrode vorzuziehen.

VII. Die gebräuchliche Prüfungsmethode von Elektroden jeder Art mit Hilfe von Standardacetat genügt nicht zur eindeutigen Beurteilung des Elektrodenzustandes. Sie ist nur dann ausreichend, wenn mit den Elektroden *gepufferte* Lösungen untersucht werden sollen Kommen ungepufferte Lösungen zur Untersuchung, so ist daran zu denken, daß eine U-Elektrode, die gegenüber Standardacetat einen richtigen Wert ergibt, bei der Messung von pufferfreien Lösungen fehlerhaft sein kann.

Für diese Fälle kann die Eichflüssigkeit nur eine ungepufferte Lösung sein.

Die Spritzenelektrode[1]) ist durch die Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N 39, Scharnhorststraße, zu beziehen.

---

[1]) D. R.-P. angemeldet.

Die Elektrotitration in physiologischen Flüssigkeiten.

I. Mitteilung:

Die Bestimmung der Chloride im Blute und Serum.

Von

Ernst Mislowitzer und Marthe Vogt.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität. Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. März 1925.)

I. Die Chloride im Blute oder Serum werden nach dem trocknen oder feuchten Veraschen der organischen Substanz als Chlorsilber gefällt und entweder gravimetrisch oder titrimetrisch bestimmt. Zum Arbeiten mit kleinen und kleinsten Mengen werden nur titrimetrische Methoden verwandt, wobei die bekannten *Volhard*schen oder *Mohr*schen Methoden in nur wenig veränderter Form zur Anwendung kommen.

Zu den Messungen mit Farbindikatoren kamen in den letzten Jahren die elektrometrischen Methoden hinzu, bei denen der Endpunkt der Titration durch den sogenannten „Potentialsprung" angezeigt wird. Die Übertragung dieser bisher nur für anorganische Lösungen ausgearbeiteten Methoden auf physiologische Flüssigkeiten erschien aus mehreren Gründen vorteilhaft.

Die elektrometrische Chloridbestimmung ist von *Müller*[1]) eingehend beschrieben worden. *Müller* konnte zeigen, daß die Genauigkeit dieser Methode durchaus derjenigen der früheren Verfahren entspricht und sie beim Arbeiten mit sehr geringen Mengen sogar noch übertrifft. Für gewisse Fragen hat die Elektrotitration schon den Vorrang gegenüber den älteren Methoden errungen, z. B. für die quantitative Analyse einzelner Ionenarten in Ionengemischen.

II. Bei der Anwendung der elektrometrischen Titration auf Blut war zunächst der Einfluß der Eiweißkörper auf die Bestimmung

---

[1]) *Erich Müller*, Die elektrometrische Maßanalyse, 1921.

zu untersuchen. Es ergab sich, daß eine potentiometrische Titration in Gegenwart von gelöstem Eiweiß unmöglich ist, die Koagulation des Eiweißes zur Behebung dieser Schwierigkeit aber genügt. Schwermetalle kamen als Fällungsmittel nicht in Betracht. Die Alkoholfällung erwies sich wegen der Notwendigkeit, den Alkohol wieder zu entfernen (s. unten) als zu umständlich. Am geeignetsten ist die Koagulation des Eiweißes durch Erhitzen im isoelektrischen Punkte, der durch eine Monokaliumphosphatlösung hergestellt wird.

III. Zur Ausführung der Bestimmung wird 1 ccm zehnfach verdünnten Blutes tropfenweise einer siedenden 2proz. Monokaliumphosphatlösung (etwa 5 ccm) zugesetzt und nach wenigen Sekunden das Sieden unterbrochen. Nach dem Erkalten werden 3 bis 5 Tropfen etwa 20proz. Salpetersäure zugegeben. Die Titration kann nun unmittelbar angeschlossen werden. Am geeignetsten ist die Benutzung einer Elektrode, die gleichzeitig als Rührvorrichtung dient. Die Bezugselektrode ist beliebig. Die Elektrodenflüssigkeit wird durch einen Stromschlüssel (s. *Müller*) mit der zu titrierenden Flüssigkeit leitend verbunden. Der Schlüssel wird mit gesättigter Kaliumnitratlösung gefüllt. Es wird mit n/100 Silbernitratlösung titriert. Eine wesentlich stärkere Verdünnung der Silberlösung kommt nicht in Frage, da das Gesamtvolumen bei der Titration sonst zu sehr wachsen würde (s. unten).

Zur Potentialmessung wurde das neue Potentiometer (vgl. S. 68) benutzt.

IV. Wie bei der p_H-Messung, sind auch bei der elektrometrischen Titration oberflächenaktive Substanzen störend. Das ist für Äthyl-, ganz besonders aber für Amylalkohol zu beachten. Ein Überschuß an Salpetersäure hindert ebenfalls die Titration, da die Silberelektrode angegriffen wird. Das Volumen der zu titrierenden Flüssigkeit muß so gering wie möglich gehalten werden. Die Schärfe des Umschlags ist um so größer, je geringer das Volumen ist.

Bei einiger Übung nimmt eine Bestimmung etwa eine Viertelstunde in Anspruch. Ein weiterer Vorzug dieser Methode ist in der Möglichkeit zu sehen, nach beendeter Chloridtitration noch auf weitere Ionen zu untersuchen. Eine elektrometrische Natriumbestimmung, bei der der letzte Abschnitt der jodometrischen Natriumtitration potentiometrisch ausgeführt wird, kann z. B. unmittelbar angeschlossen werden.

V. Wir geben einige Versuchsresultate wieder, die als Vergleich zwischen den verschiedenen Methoden dienen mögen.

1. 2 ccm einer Kaliumchloridlösung verbrauchten, ohne Vorbehandlung elektrometrisch titriert, 4,25 ccm einer n/200 Silbernitratlösung.

Nach Zugabe von 0,5 ccm chloridfreien, dialysierten Serums und Koagulation mit Monokaliumphosphat: 4,25 ccm.

2. Chloridfreies Serum wurde mit einer analytisch abgewogenen Menge Natriumchlorid versetzt und folgende Versuche mit der Lösung angestellt: Es wurden

a) 1 ccm koaguliert und das Filtrat nach *Volhard* titriert,
b) Mikrobestimmungen nach *Bang* ausgeführt,
c) elektrometrisch titriert mit 0,1 ccm Serum.

Wir fanden nach a), b), c):

a	b	c	Theoretischer Wert	
106	107	106	105	Milliäquivalente Cl im Liter.

3. Nach diesen Voruntersuchungen gingen wir zu eigentlichen Serum- und Blutanalysen über. Für Hundeserum ergab sich nach a), b), c):

a	b	c	
116	117	115	Milliäquivalente im Liter.

4. Für ein anderes Serum nach Veraschung von 1 ccm mit Permanganat und Titration nach *Volhard* (d) und Elektrotitration (c):

d	c	
105,6	105	Milliäquivalente Cl im Liter.

5. Für Blut nach b) und c):

b	c	
94	95	Milliäquivalente Cl im Liter.

Die Untersuchungen a) und d) wurden in dankenswerter Weise von Herrn *Petow* aus der I. medizinischen Klinik der Charité ausgeführt.

Zur Kenntnis der Vitamine.

V. Mitteilung:

Speicherung von Vitamin A bei jungen weißen Ratten nach Zulage von Pferdefleisch an die Mütter während der Trächtigkeit und bis zum Versuchsbeginn.

Von

Arthur Scheunert und **A. J. Candelin.**

(Aus dem veterinär-physiologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 28. März 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

In der vierten Mitteilung[1]) wurde gezeigt, daß gekochtes mageres Pferdefleisch Vitamin A enthält. Diese Untersuchungen wurden dadurch angeregt, daß es plötzlich nicht mehr gelang, bei vitamin-A-freier Ernährung Wachstumsstillstand und Keratomalacie darzustellen. Dies hing offenbar mit der Übersiedelung der Rattenkolonie von Berlin nach Leipzig zusammen, da vorher und auch bei Rattenwürfen, die noch aus Berlin stammten, regelmäßig bei vitamin-A-freier Kost in 20 bis 30 Tagen Keratomalacie zum Ausbruch kam, während bei Würfen von Ratten, die in Leipzig trächtig geworden waren, bei vitamin-A-freier Kost selbst nach 8 Wochen und mehr noch Wachstum bestand und Keratomalacie ausblieb. Da bei langem vergeblichen Suchen andere Ursachen nicht gefunden werden konnten, mußte die verabreichte Normalnahrung der Zuchtratten als Ursache angesehen werden. Diese war durch Zulage von kleinen Mengen gekochten Pferdefleisches etwas eiweißreicher gemacht worden, und da die pflanzlichen Bestandteile der Kost nicht besonders reichlich Vitamin enthielten, konnte nur im Pferdefleisch die Ursache erblickt werden. Dies wurde in der vierten Mitteilung bestätigt. Es mußte also eine Speicherung von Vitamin A bei den jungen Tieren stattgefunden haben. Daß gerade Vitamin A leicht und reichlich vom Organismus der Ratte gespeichert wird, ist bekannt und durch zahlreiche Untersucher erhärtet worden. Es findet sich besonders in den drüsigen Organen des Tier-

[1]) *A. Scheunert* und *Ch. Hermersdörfer*, diese Zeitschr. **156**, 58, 1925.

körpers und kann so reichlich gespeichert sein, daß sehr lange Zeit vergeht, bis auch bei peinlichster Vermeidung von Vitamin-A-Zufuhr die bekannten Erscheinungen auftreten [*Mc Collum* und *Davis*[1]), *Osborne* und *Mendel*[2]), *Mc Collum*, *Simmonds* und *Parsons*[3]), *Zilva* und *Drummond*[4]), *Drummond*, *Golding* und *Coward*[5]), *Daniels* und *Nichols*[6]), *Aron* und *Gralka*[7]), *Steenbock*, *Sell* und *Nelson*[8]) u. a.]. Insbesondere haben die letztgenannten Autoren die Verhältnisse eingehend beleuchtet und auf die Bedeutung dieses Speicherungsvermögens für Versuchsanstellung hingewiesen.

Bestanden diese Angaben zu Recht, woran nicht zu zweifeln war, so mußte sich auch bei unseren Ratten die Speicherung nachweisen lassen und hierdurch auch der Vitamin-A-Gehalt des Pferdefleisches erhärtet werden. Zu diesem Zwecke wurden die folgenden Versuche an jungen wachsenden Ratten durchgeführt.

Methodisches.

Das Futter der trächtigen Muttertiere bestand aus Reis, Brot, Möhren, magerem Pferdefleisch und Milch. Das Pferdefleisch wurde weichgekocht, von ihm wurden ebenso wie von Brot und Möhren ungefähr 3 bis 4 g gefüttert. Auch der Reis wurde gekocht verabreicht, die Tiere erhielten davon soviel sie fressen wollten. Vor dem Verabreichen wurde der Reis mit der Fleischbrühe vermengt. Die tägliche Milchgabe betrug 10 ccm und wurde getrennt von der anderen Nahrung gegeben. Diese Ernährung wurde auch beibehalten, als die Muttertiere geworfen hatten; die Würfe waren 9 bis 10 Stück stark.

Die Jungen blieben bei der Mutter, bis sie ein Gewicht von etwa 40 bis 55 g erreicht hatten, was nach ungefähr 4 Wochen der Fall war. Dann wurden sie in den Versuch genommen und auf Versuchskost gesetzt. Die jungen Tiere hatten also, abgesehen von der vitaminhaltigen Ernährung während des intrauterinen Lebens, eine vitaminhaltige Milch von seiten der Mutter und auch, sobald sie selbst Nahrung aufzunehmen begonnen hatten, eine vitaminhaltige Kost erhalten.

Die Durchführung der Versuche erfolgte in der früher beschriebenen Weise. Die Grundration bestand aus Casein (*Merck*) 18 Proz., Fett 15 Proz., Cellulose 2 Proz., Salzgemisch 6,14 Proz., Stärke 58,86 Proz. Vitaminfreiheit war in üblicher Weise durch Extraktion gesichert, das Salzgemisch entsprach annähernd dem von *Osborne* und *Mendel* angegebenen und war nach den Vorschlägen von *Ragnar Berg*[9]) etwas verändert worden. Vitamin-B-Zulage erfolgte durch Ersatz von Stärke (5 Proz.) durch Trockenhefe.

---

[1]) *McCollum* und *Davis*, Journ. of biol. Chem. **21**, 179, 1915.
[2]) *Osborne* und *Mendel*, ebendaselbst **32**, 309, 1917; **34**, 17, 1918.
[3]) *McCollum*, *Simmonds* und *Parsons*, ebendaselbst **42**, 111, 1921.
[4]) *Zilva* und *Drummond*, Lancet 1922, S. 1243.
[5]) *Drummond*, *Golding*, *Zilva* und *Coward*, Biochem. Journ. **14**, 742, 1920.
[6]) *Daniels* und *Nichols*, Journ. of biol. Chem. **32**, 91, 1917.
[7]) *Aron* und *Gralka*, diese Zeitschr. **115**, 188, 1921.
[8]) *Steenbock*, *Sell* und *Nelson*, Journ. of biol. Chem. **56**, 327, 1923.
[9]) *Ragnar Berg*, Die Vitamine. Leipzig 1922.

Experimenteller Teil.

1. Zunächst mußte dargetan werden, daß die Tiere bei vitaminfreier Grundnahrung und Zulage von Vitamin A und B ein befriedigendes Wachstum zeigen. Zur vitamin-B-haltigen Grundkost erhielten zwei Tiere je 0,5 g Butterfett täglich, zwei andere je 0,033 g Lebertran. Die Buttertiere (Abb. 1, Nr. 166, 167) entsprachen bei einer durchschnittlichen Nahrungsaufnahme von 11,1 g in ihrer Entwicklung unseren Erfahrungen, die Lebertrantiere (Nr. 168, 169) nicht (Nahrungsaufnahme durchschnittlich 10,4 g). Am 30. Tage kam bei ihnen das Wachstum zum Stillstand, die Tiere sahen sehr schlecht aus, hatten struppiges Fell und setzten dünnen Kot ab. Die Ursache wurde auf den Lebertran geschoben. Nach Weglassen des Lebertrans besserte sich der Zustand, und das Wachstum kam wieder in Gang, so daß man am 40. Tage erneut den Lebertran zuführen konnte. Eine Förderung des Wachstums durch diese Zugabe war unverkennbar, aber bald trat wieder Stillstand ein. Ratte 168 konnte bei langsamem Wachstum noch längere Zeit im Versuch gehalten werden, sie erhielt noch eine weitere Hefezulage. Am 82. Tage wurde auch dieser Versuch abgebrochen. Der Verlauf ist nicht so eindeutig wie bei den Butterratten, der Versuch zeigt aber, daß die Ursache im Lebertran liegt, den die Ratten schlecht vertragen.

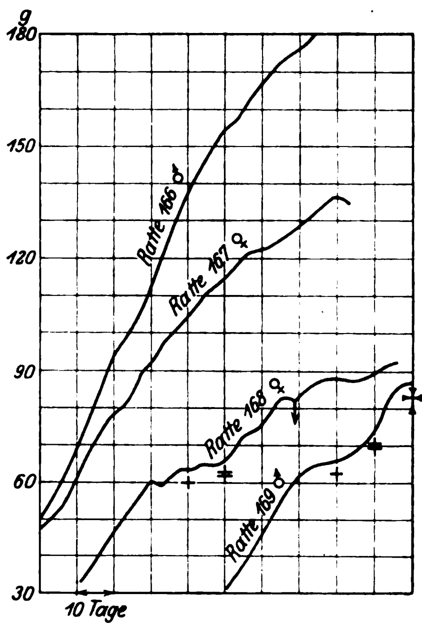


Abb. 1. Vorfütterung mit einer Ration, die Pferdefleisch enthielt. Versuchsfütterung: Vitamin-B-haltige Grundkost + Zulage von Vitamin A (Butter bzw. Lebertran). + Wegnahme von Lebertran. ≠ Zulage von Lebertran. ▼ Zulage von Hefe.

2. Weiter war die Frage zu beantworten, ob und wie lange Wachstum bestehen bleibt, wenn Vitamin A in der Nahrung fehlt. Vier Tiere wurden dazu ohne Vitamin A, aber mit Vitamin B ernährt. Wie Abb. 2 zeigt, ging trotz des Fehlens von Vitamin A in der Nahrung das Wachstum bei allen Tieren gut, ja anfangs etwa mit derselben Geschwindigkeit wie bei den Normaltieren (Abb. 1) vonstatten (durchschnittliche Nahrungsaufnahme täglich 10,4 g). Die Tiere bewahrten auch ihr normales Aussehen. Die Ratte 164 erkrankte am 20. Tage akut und starb am 23. Tage an Harnverstopfung, die durch Einkeilung von Harnsteinen verursacht wurde. Die anderen drei Tiere zeigten

erst nach längerer Zeit eine Verminderung des Wachstums. Schließlich kam es zum Wachstumsstillstand, wobei die tägliche Nahrungsaufnahme auf 8,3 g zurückging. Bald nachher, und zwar bei Ratte 163 am 53. Tage, bei Ratte 162 am 67. Tage und bei Ratte 163 sogar erst am 79. Tage entwickelte sich Keratomalacie. Diese konnte durch Zugabe von Lebertran alsbald geheilt werden. Bei Ratte 163 und 165 kam

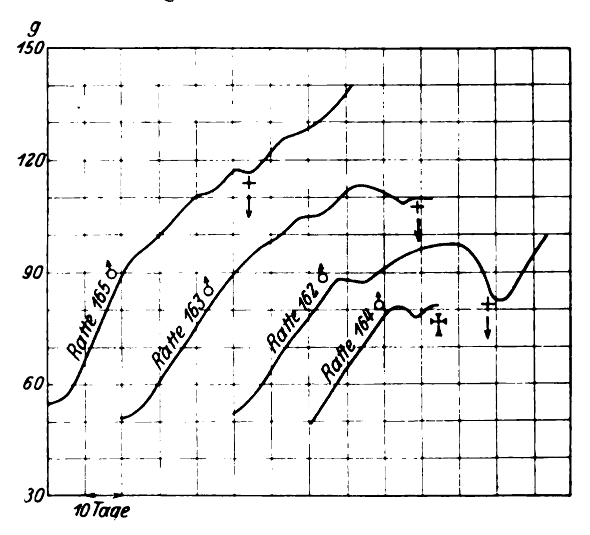


Abb. 2. Vorfütterung mit einer Ration, die Pferdefleisch enthielt. Versuchsfütterung: Vitamin-B-haltige Grundkost, keine Zulage von Vitamin A. + Keratomalacie. ▼ Zulage von Lebertran.

auch bis zum Versuchsschluß am 82. Tage das Wachstum von neuem in Gang und die Nahrungsaufnahme stieg auf die ursprüngliche Höhe. Der Versuch zeigt eindeutig, daß in der Tat bei den Tieren erst spät und nach recht verschiedenen Zeiten Mangelerscheinungen durch Fehlen des Vitamins A in der Kost auftraten, und daß diese durch erneute Vitamin-A-Zufuhr (Lebertran) behoben werden konnten. Wenn dieses relativ späte Auftreten der Erscheinungen des Mangels an Vitamin A auf die Pferdefleischfütterung zurückzuführen ist, so mußten bei

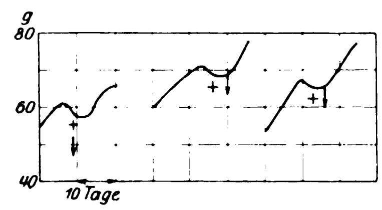


Abb. 3. Vorfütterung mit einer Ration, die kein Pferdefleisch enthielt. Versuchsfütterung: Vitamin-B-haltige Grundkost. + Keratomalacie. ▼ Zulage von Butter.

einer Vorfütterung ohne Pferdefleisch die Mangelerscheinungen schneller in Erscheinung treten. Dies ist nun in der Tat der Fall. Wurde nämlich das Pferdefleisch aus der Kost weggelassen, so konnten Wachstumsstillstand und Keratomalacie bereits nach 9 bis

16 Tagen erzielt werden (Abb. 3). Die Kost bestand dabei aus Brot, Milch, Möhren und Hafer und war allerdings dann zur Erzielung einer befriedigenden Nachzucht nicht hinreichend. Damit wird gezeigt, daß tatsächlich eine Speicherung von Vitamin A infolge der Fütterung mit Pferdefleisch stattgefunden hatte.

3. Durch eine weitere Gruppe von Versuchen sollte das Verhalten der Tiere bei völlig vitaminfreier Kost dargestellt werden.

Die Ratten 176 bis 179 erhielten zunächst nur vitaminfreie Grundnahrung. Bei Stocken des Wachstums sollte durch Vitamin-B-Zulage gezeigt werden, daß hierdurch das Wachstum wieder hervorgerufen werden könne. In der ersten Periode ohne jegliche Vitaminzufuhr betrug die tägliche Nahrungsaufnahme im Durchschnitt 7,0 g und wurde durch Zulage von Apfelsinensaft auf 8,0 g und durch Zugabe von Hefe auf 7,8 g erhöht. Abb. 4 zeigt den Verlauf

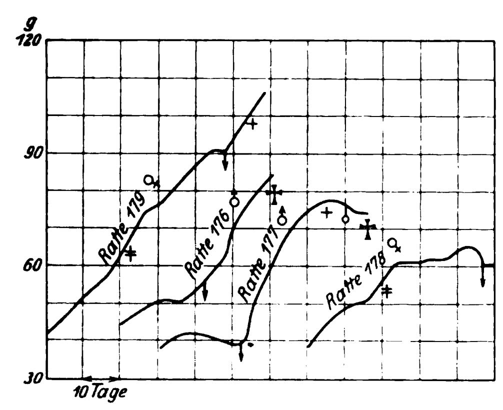


Abb. 4. Vorfütterung mit einer Ration, die Pferdefleisch enthielt. Versuchsfütterung: Vitaminfreie Grundkost.
+ Keratomalacie. ↓ Zulage von Hefe. ‡ Apfelsinensaft. ♁ Zulage von Butter.

der Wachstumskurven. Die Versuchstiere verhielten sich etwas verschieden. Ratte 177 wuchs sehr bald überhaupt nicht mehr, Ratte 176 nur recht unbedeutend, besser aber die Ratten 178 und 179. Die Tiere gingen durchweg im Aussehen so stark zurück, daß Ableben befürchtet werden mußte. Am 22. Tage erhielten sie deshalb Zulagen, und zwar Ratten 176 und 177 je 0,5 g Hefe, die beiden anderen Ratten je 1 ccm Apfelsinensaft.

Der Erfolg war verschieden. Das Wachstum kam bei den Hefetieren sofort erheblich in Gang, aber bald zeigten sich Folgen des Mangels an Vitamin A. Ratte 176 verendete am 41. Tage ohne Anzeichen, Ratte 177 aber am 55. Tage nach Wachstumsstillstand (am 37. Tage) und Keratomalacie am 47. Tage. Eine Butterzulage heilte die Augenerkrankung, das Tier konnte aber nicht gerettet werden,

weil es, wie die spätere Sektion ergab, an Harnsteinen litt, die die Harnröhre verstopft hatten und den Tod des Tieres herbeiführten. Bei Ratte 178 genügte der Apfelsinensaft nicht, um Wachstum und Wiederherstellung normalen Befindens zu erzielen. Auch dieses Tier starb am 48. Tage an Darmentzündung. Ratte 179 hingegen vermochte sich mit Apfelsinensaft besser zu erholen und konnte, als sie vom 44. bis 47. Tage Wachstumsstillstand zeigte, durch Hefe wieder zu erneuter Gewichtszunahme gebracht werden. Der Apfelsinensaft hatte danach nicht genügend Vitamin B zugeführt. Infolge des noch bestehenden Mangels an Vitamin A trat dann am 55. Tage Keratomalacie auf, die durch Butterzulage wieder behoben werden konnte.

Dieser Versuch bestätigt also die bisherigen Ergebnisse: Die Versuchsratten besitzen eine erhebliche Reserve an Vitamin A, hingegen keine Reserven an Vitamin B. Die ersteren genügten für mehrere Wochen, um den Bedarf des Tieres zu decken, Wachstum zu sichern und Keratomalacie zu verhüten.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß durch Fütterung von Pferdefleisch an Zuchtratten und deren Würfe eine erhebliche Speicherung von Vitamin A bewirkt werden kann. Dies ist auf den früher nachgewiesenen Gehalt des Pferdefleisches an Vitamin A zurückzuführen. Wenn es auf Vorbereitung von Rattenwürfen zu Versuchen über Vitamin A ankommt, kann deshalb durch den Gehalt der Vorfütterungskost an Pferdefleisch das Eintreten der Mangelerscheinungen sehr verzögert werden.

Zur Untersuchung der Eiweißkörper des Blutes. I.

Von

Hermann Hueck.

(Aus der chirurgischen Universitätsklinik Rostock.)

(Eingegangen am 28. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Natives und defibriniertes Serum.

Der Begriff des Blutserums galt bis vor kurzem als ein wohlumschriebener. Das Serum wurde gewonnen teils als natives Serum nach spontanem Auspressen aus dem Blutkuchen nach erfolgter Gerinnung, teils aus dem defibrinierten Blute nach spontaner oder künstlicher Sedimentierung der Formelemente. Der eine Forscher nimmt die eine Form, der zweite die andere als Untersuchungsobjekt, und man findet nirgends einen Einwand dagegen, daß diese Sera einfach identifiziert werden. *Lampé* erwähnt z. B. im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden bei den beiden Gewinnungsarten keinen Unterschied. Bei reafraktometrischen Messungen, die an beiden Serumarten bei ein und derselben Blutentnahme gemacht wurden, finde ich aber Differenzen im Eiweißgehalt, die zwar klein sind, aber in einer Reihe von Untersuchungen regelmäßig wiederkehren.

Es wurde aus der leicht und nur momentan gestauten Vena cubiti Blut mit der *Strauß*schen Kanüle in mehreren Zentrifugiergläschen gewonnen. Einige wurden bei Zimmertemperatur stehengelassen, nach erfolgter Gerinnung nach etwa 1 Stunde das native Serum mit Pipette abgehoben, bei mittlerer Umdrehungszahl kurz — höchstens 5 Minuten — zentrifugiert, das klare Serum vom Erythrocytenrest am Grunde abgehoben und untersucht. Bei ein oder zwei der anderen Röhrchen wurde das Blut sogleich nach der Entnahme mit Glasstab vorsichtig so lange geschlagen, bis Fibringerinnsel, die jeweils vom Stabe abgewischt wurden, sich nicht mehr bildeten. Sodann Zentrifugierung, Abheberung des Serums, nochmalige kurze Bearbeitung in der Zentrifuge und Untersuchung. Zu stark geschlagenes Blut, das sich grob makroskopisch durch Hämolyse anzeigte, wurde nicht benutzt. Es wurde Wert darauf gelegt, daß die Einwirkung der Zentrifugierung auf beide Serumproben gleich lange stattfand. Auch

wurde aus später noch zu erörternden Gründen die Reihenfolge in der Entnahmezeit variiert, die zur Defibrinierung benutzten Proben möglichst zwischen zwei als natives Serum untersuchte Proben gelegt. Um gröberen Wasserverlust durch Verdunstung zu verhindern, wurden die Röhrchen in einer Zahl von Fällen fest verkorkt gehalten, in einer anderen mit Paraffinum liquidum sofort nach der Blutentnahme überschichtet. Da die Temperatur auch die gleiche blieb, schienen mir gröbere Fehler vermieden zu sein. Von jedem Serum wurden 1 bis 2 Tropfen in dem *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer untersucht, die Werte nach jeweils 10 Minuten abgelesen. Kritik und technische Einzelheiten dieses Apparats folgen weiter unten.

Das aus dem Blutkuchen ausgepreßte Serum wird kurz als Serum nativ., das durch Defibrinieren des Blutes gewonnene als Serum defibrin. bezeichnet.

Tabelle I.

Refraktometrische Eiweißbefunde bei nativem und defibriniertem Serum.

Serum nativ. Eiweiß in Proz.	Serum defibrin. Eiweiß in Proz.	Serum nativ. Eiweiß in Proz.	Serum defibrin. Eiweiß in Proz.	Serum nativ. Eiweiß in Proz.	Serum defibrin. Eiweiß in Proz.
6,70	6,64	7,57	7,31	8,08	8,02
6,98	6,85	7,74	7,70	8,58	8,49
6,12	5,94	8,96	8,75	8,24	8,24
7,63	7,42	7,50	7,57	7,24	7,05
5,79	5,79	9,01	8,84	7,11	7,09

Die Tabelle I zeigt, daß in dem überwiegenden Teile der untersuchten Fälle die Refraktionswerte zwischen den beiden Serumarten differieren, und zwar zeigt das durch Defibrinieren gewonnene Serum durchweg niederere Werte als das native Serum. Die Differenz ist aber nicht die gleiche, sondern schwankt zwischen 0 und 0,26 Proz. Eiweiß. Nur einmal erscheint das Serum defibrin. etwas konzentrierter als das nativ. Wodurch die Differenz zustande kommt, ist mit Sicherheit schwer zu entscheiden. Es wäre möglich, daß beim Schlagen des Blutes mit dem Fibrinogen Teile der Globulinfraktion mitgerissen werden und zur Ausfällung kommen, und zwar je nach dem Grade der Bewegung in steigendem Umfange. Es ist aber auch die Möglichkeit zu erwägen, daß durch den mechanischen Insult eine Veränderung im Dispersitätsgrad zustande käme, die refraktometrisch Unterschiede anzeigt, bei einer der Fällungsmethoden aber doch gleichen Eiweißgehalt aufwiese. Die Lösung dieser noch offenen Frage bleibe weiteren Untersuchungen vorbehalten. Ob bei solchen Veränderungen Differenzen in der Kohlensäurespannung eine Rolle spielen, wäre auch zu diskutieren.

Nach *Ewald, Koranyi* und *Bence* ist die CO_2 zwar ohne meßbaren Einfluß auf die Viskosität und Eiweißkonzentration des Serums allein, jedoch soll die Einwirkung von CO_2 auf das Gesamtblut eine Quellung der Blutkörperchen hervorrufen (*Hamburger, v. Limbeck*) durch Aufnahme von Wasser und Anionen besonders Cl, vielleicht auch infolge Durchtritt

von Eiweißen durch die Blutkörperchenmembran. Auch *Determann* nimmt osmotische Wechselbeziehungen zwischen Blutkörperchen und Plasma an. Diese Befunde wurden neuerdings bestätigt und erweitert durch *Mukai, Kloth. Meyer, Hasselbalch, Warburg.* Letztere nehmen an, daß je nach dem Grad der CO_2-Spannung die Wanderung der Ionen zwischen Blutkörperchen und Serum in verschiedener Richtung verlaufen können. *v. Frey* erklärt durch diese CO_2-Spannungsschwankungen manche Unregelmäßigkeiten in den Eiweißbefunden, auf die weiter unten näher eingegangen wird. Daß eine natürliche oder künstliche Erhöhung der CO_2 des Blutes die Untersuchungswerte beeinflußt, ist seit langem bekannt. *Wiener* fand im Venenblut der Tiere einen größeren Anteil an Globulin als im arteriellen Blute. Bei Venenblut wurde refraktometrisch ein höherer Eiweißwert (nach *Reiss* 0,11 Proz., nach *Alder* 0,2 bis 0,3 Proz.) gefunden als im Kapillarblut. Nur längere Stauung soll den Wert wesentlich erhöhen (*Böhme, Schwenker, v. Koranyi, Bence, Reiss*), doch soll die Viskosität gleichsinnig ansteigen (*Alder*). Viskosimetrisch wurde eine Erhöhung im Venenblut durch CO_2 infolge Stauung von vielen Untersuchern festgestellt (*Frischberg, W. Müller, F. Müller, Bence, Determann, Kottmann, Bachmann, Jorns, Adam, Trump, Hess, Kagan*). Es wird daher von *Frischberg* arterielles Blut zur Untersuchung verlangt, von *Hess, Kagan, Bogendörfer* und *Nonnenbruch* u. a. arterialisiertes Kapillarblut. Da nach *Reiss* bei Vermeidung stärkerer Stauung die Unterschiede zwischen Venen- und Kapillarblut aber nicht wesentlich höher befunden wurden als bei Kapillarblut bei verschiedenen Entnahmen, habe ich mich, zumal ich meistens größere Blutmengen brauchte, zur Venenpunktion entschlossen, dabei entweder auf die Stauung ganz verzichtet, oder, wenn sie notwendig war, auf ein Minimum reduziert.

Nach obigem ist also der Gedanke naheliegend, daß durch das Schlagen des Blutes beim Defibrinieren infolge des länger anhaltenden Kontaktes der Blutkörperchen mit der Luft CO_2 aus den Erythrocyten entweicht und dadurch eine Entquellung eintritt, d. h. ein vermehrter Wasseraustritt aus den Blutkörperchen ins Blut, wodurch die relative Eiweißverminderung erklärt wäre. Welche von den drei Hypothesen zu Recht besteht, bleibe dahingestellt. Die Tatsache, daß einige Zahlen der beiden Sera übereinstimmen, zeigt, daß bei vorsichtigster Behandlung auch gleiche Werte zu erzielen sind. Da aber dem Serum äußerlich nicht anzusehen ist, ob beim Defibrinieren eine Eiweißverminderung stattgefunden hat, habe ich es vorgezogen, im folgenden nur natives Serum zur Untersuchung zu benutzen. Aber auch beim nativen Serum allein zeigten sich bald Schwierigkeiten exakter Bewertung.

Schichtungen bei der Auspressung des nativen Serums.

Daß sich Serum bei längerem Stehen ändert, ist bekannt. Nach 24stündigem Aufheben im Eisschrank habe ich oft Unterschiede bis zu einer Pulfricheinheit und darüber erhalten, das sind über 0,2 Proz. Eiweiß, und zwar in dem Sinne, *daß das gestandene Serum höher konzentriert befunden wurde. Wenn das Serum mit dem Blutkuchen auf-*

gehoben war, war die Differenz besonders auffallend, was leicht durch die osmotischen Wechselwirkungen zwischen den Blutkörperchen und dem Serum zu erklären ist. Es zeigte sich in diesen Fällen bisweilen eine leichte Hämolyse. Aber auch das abgeheberte und so aufbewahrte Serum wies Konzentrationserhöhungen auf. Die Möglichkeit eines geringen Wasserverlustes ist trotz luftdichter Verkorkung nie ganz von der Hand zu weisen. War das Serum durch überschichtetes Paraffinum liquidum jeder Luftwirkung entzogen, wurden die Differenzen geringer, waren aber doch oft noch nachweisbar. Es muß also mit der Möglichkeit physikalisch-chemischer Zustandsänderungen bei längerem Stehen gerechnet werden. Dafür spricht, daß sich die gleichzeitig einstellende Viskositätserhöhung mittels Durchblasen von Luft fast bis zum Ausgangspunkt zurückbringen läßt. Der Refraktionswert bleibt bei dieser Manipulation aber unverändert, steigt sogar meistens noch. Ob letzteres nur durch Wasserverlust oder auch durch Zustandsänderungen bedingt ist, bleibe dahingestellt. Meines Erachtens spielt die CO_2-Adsorption bei diesen Veränderungen eine große Rolle.

P. Lecomte du Nouy (referiert nach *Pincussen*) konnte mit Hilfe des von ihm angegebenen Tensiometers feststellen, daß die Oberflächenspannung bei Aussetzung des Serums an die Luft sich sehr schnell erniedrigt. Schüttelt oder rührt man das Serum nach Eintritt der Erniedrigung um, so steigt die Spannung wieder an. Es erscheint mir nicht unmöglich, daß diese Beobachtung mit der meinen einen gewissen Parallelismus aufweist.

Die Tatsache, daß auch beim Abstehenlassen vom Morgen bis zum Nachmittag deutliche Konzentrationsänderungen feststellbar waren — bei dem auf dem Cruor abstehenden Serum bis zu 0,7, bei dem rein aufbewahrten Serum bis zu 0,3 Pulfricheinheiten —, zwangen mich zu der Versuchsanordnung, das in den ersten 2 Stunden nach der Entnahme gewonnene Serum stets in den Vormittagsstunden noch zu verarbeiten, dazu aber sowohl das Blut nach der Entnahme, wie das Serum nach erfolgter Abheberung sofort mit Paraffinum liquidum zu überschichten. Dieser letzte Modus, der auch von *Leendertz, v. Frey, Starlinger* u. a. geübt wird, scheint mit die exaktesten Werte zu geben.

Es waren jedoch auch Konzentrationsdifferenzen nachzuweisen in den verschiedenen Schichten von Seren, die einige Stunden oder gar Tage auf Blutkuchen abgestanden hatten. Ich habe in der Literatur keine Angaben über dieses Phänomen gefunden. *Rusznyak* nimmt zwar an, daß die Eiweißkörper im Serum zum großen Teil molekular gelöst seien, die verbreitetste Anschauung rechnet aber wohl mit der Verteilung der Eiweiße als hydrophile Kolloide im Serum, die allerdings in vielen grundlegenden Eigenschaften den echten molekularen Lösungen näher stehen als den Suspensionskolloiden (*Höber*). Es war so von vornherein die Notwendigkeit einer Schichtung nicht zu bejahen,

denn echte Lösungen halten sich meines Wissens nicht längere Zeit in verschiedenen Konzentrationsschichten. Die erhobenen Befunde bestätigen aber beim Serum die Möglichkeit.

Botazzi berichtet von Experimenten, bei denen mittels Gefrieren von Serum und darauf folgendem langsamen Auftauen ein Konzentrationsunterschied der Kolloide herbeigeführt wurde. Auch hier zeigten sich die unteren Schichten von höherer Eiweißkonzentration und größerer Viskosität als die obere Schicht. Der Beweis wurde erbracht durch Stickstoffbestimmungen der aus den verschiedenen Schichten entnommenen Proben. *Abderhalden* berichtet, daß die verschiedenen Schichten der Blutkörperchensäule beim wiederholten Zentrifugieren ein verschiedenes Verhalten zeigen und beibehalten. Er schließt daraus, daß sie nach ihrem chemisch-physikalischen Verhalten nicht einheitlich zu sein scheinen. Sollten dabei nicht Konzentrationsschichtungen des Suspensionsmittels auch eine Rolle spielen, die erst sekundär die Oberfläche der Erythrocyten umstimmen?

Wenn also unter künstlicher Einwirkung eine Absetzung des Serums in verschiedenen Konzentrationsgraden vorkommt, kann die theoretische Möglichkeit nicht von der Hand gewiesen werden, daß bei der spontanen Serumauspressung gleichfalls eine Schichtung in Stufen erfolgt, wenn die Auspressungsphasen in verschiedener Konzentration erfolgen sollten. In der Tat fand ich bei längerem Stehen des geronnenen Blutes fast regelmäßig die oberste Lage des nativen Serums oberhalb des Blutkuchens von geringerem Eiweißgehalt (0,2 bis 0,5 Pulfricheinheiten) als die tieferen Schichten oder das nachher abzentrifugierte Gemisch. Hat sich aber einmal eine Schichtung vollzogen — sei es spontan, sei es artefiziell —, so ist bei der sehr langsamen Diffusionsfähigkeit der Eiweißstoffe anzunehmen, daß sich der Zustand verhältnismäßig hartnäckig halten wird. Es sei hier also die Notwendigkeit der dem Chemiker oder Physiologen sicher geläufigen Maßnahme unterstrichen, jedes Serum, besonders das länger auf dem Blutkuchen abgestandene, einer gründlichen Durchmischung zu unterziehen, ehe man so kleine Mengen, wie man sie für Refraktion oder Viskositätsmessungen braucht, mit der Pipette entnimmt.

Diese Beobachtungen veranlaßten mich, das Serum in den verschiedensten Auspressungsphasen zu untersuchen.

In ein hohes Reagenzglas ließ ich Blut aus der Armvene einfließen. Darauf sofortige Überschichtung mit Paraffinum liquidum. Nach erfolgter Gerinnung wurde in verschiedenen Zeitabständen — nach 30, 50, 70 Minuten usw. — das Serum unter dem Paraffin bis zum Blutkuchen abgehebert, in kleine verkorkte Röhrchen gebracht und kurz zentrifugiert. Viskosimetrisch zeigten sich keine oder nur sehr inkonstante Differenzen, in seltenen Fällen immerhin bis zu 0,05 Skalenteilen des *Hess*schen Apparats. Die refraktometrischen Befunde sind in Tabelle II wiedergegeben. Zur Kontrolle wurden die Proben zum Teil noch im Interferometer untersucht. Auf die genaue Technik des Apparats gehe ich hier nicht ein, sondern verweise auf die Arbeiten von *Hirsch* und *Löwe*. Es sei nur kurz erwähnt, daß

auch durch das Interferometer die optische Dichtigkeit einer Substanz bestimmt wird.

Es wurde die Interferenz gegen Aqua dest. bestimmt, das bei Verdunstung seinen Wert nicht verändert. Dabei war bei dem mir zur Verfügung stehenden Apparat nur die 1-mm-Kammer zu benutzen. Bei der 5-mm-Kammer würden die Unterschiede fünfmal so hoch ausfallen, aber beim Vergleich mit Aqua dest. langte dazu die Trommelskala nicht aus. Die beim Versuch 1, 2, 3 und 5 in der Tabelle II in zweiter Reihe registrierten Zahlen geben die Interferenzwerte gegen Aqua dest. an. Der Nullpunkt des Apparats liegt bei 116 Trommelteilen.

Daß der Parallelismus zwischen Refraktion- und Interferometerwert in jeder einzelnen Reihe nicht ganz streng ist, darf nicht wundernehmen, da einmal mit einem gewissen kleinen Ablesefehler bei beiden Apparaten zu rechnen ist, zum anderen lag zwischen den Untersuchungen am einen und anderen Apparat gewöhnlich ein Abstand von einigen Stunden, der, wie erwähnt, gewisse kleine Konzentrationsschwankungen bedingt. Jedoch sind die Veränderungen zwischen Entnahme und 5 Stunden einerseits, und 9 bis 24 Stunden andererseits bei beiden Meßmethoden ganz gleichlaufend. Die Tatsache, daß beim Vergleich der einzelnen Reihen untereinander die Interferometerwerte der ersten Reihe in ihrer Höhe aus der erwarteten Zahlenfolge herausspringen — sie erscheinen wesentlich zu hoch —, ist mir nicht recht erklärlich. Vermutlich ist mir ein Ablesefehler bei Bestimmung der Grundzahl unterlaufen, wodurch der Vergleichswert der Reihe in sich aber nicht beeinträchtigt wird[1]).

Tabelle II.

Konzentrationsdifferenzen in den verschiedenen Auspressungsphasen des Serums.

Serum nat. ausgepreßt nach	1		2		3		4		5		6	
	Refr.	Int.	Refr.	Int.	Refr.	Int.	Refr.	Int.	Refr.	Int.	Refr.	Int.
30 Min.	50,9	—	—	—	—	—	—	—	52,2	955	—	—
50 ,,	50,9	1236	54,7	1019	59,0	1427	59,8	—	52,2	956	57,7	—
70 ,,	50,8	1233	54,6	1017	—	—	59,9	—	52,2	957	57,7	—
2 Std.	50,6	1231	54,6	1017	59,1	1427	59,8	—	52,3	957	57,8	—
4 ,,	50,7	1229,5	54,7	1019	59,3	1428	59,7	—	52,4	958	57,9	—
5 ,,	50,8	1231	54,8	1018	—	—	59,6	—	52,4	959	58,5	—
9 ,,	51,1	1238	55,1	1024	59,7	1439	60,1	—	52,6	964	59,2	—
24 ,,	51,5	1245,5	55,5	1033	—	—	60,2	—	52,8	975	59,7	—

Aus der Tabelle II geht deutlich hervor, daß sich das ausgepreßte Serum in den einzelnen Phasen nicht gleichmäßig verhält. In zwei Fällen tritt während der ersten 4 bis 5 Stunden eine geringe Konzentrations-

[1]) Daß es sich bei diesen interferometrischen Messungen nicht um Eiweißbestimmungen handelt, ist selbstverständlich. Die von *P. Hirsch* ausgearbeitete Eiweißbestimmungsmethode durch das Interferometer wurde nicht angewandt. Es sollte bei obigem Verfahren nur mit anderer Methode nachgeprüft werden, ob die refraktometrisch gefundenen Konzentrationsdifferenzen tatsächlich als solche aufrecht zu erhalten seien.

erniedrigung ein, in drei Fällen schon hier eine Erhöhung, in einem Falle bleibt es ziemlich gleich konzentriert. Zwischen der fünften und neunten Stunde ist aber eine Konzentrationserhöhung gleichmäßig vorhanden (0,2 bis 0,7 Pulfricheinheiten), die bis zum nächsten Tage eine weitere Erhöhung (0,1 bis 0,5 Einheiten) aufweist. Da diese Sera sämtlich unter Paraffinverschluß standen, ist eine namhafte Verdunstung oder sonstige Lufteinwirkung auszuschließen. Es müssen also wohl die osmotischen Beziehungen zwischen Erythrocyten und Serum eine Rolle spielen, die je nach der Lebensfähigkeit der Blutkörperchen im Cruor (O-Verbrauch und CO_2-Ausscheidung) sowohl in den einzelnen Seren wie auch in den einzelnen Auspressungsphasen differieren. Übrigens mag auch der sehr komplexe Vorgang der Gerinnung je nach Fibrinogengehalt einen verschiedenartigen Einfluß auf die Serumkonzentration ausüben. Auch kolloidale Zustandsänderungen können in Frage kommen, über die weiter unten noch zu sprechen sein wird. Wie dem auch sei, wir müssen im folgenden mit dieser Tatsache der verschiedenen Konzentration in den einzelnen Auspressungsstadien rechnen.

Vollblutserum und Plasmaserum.

Daß Serum und Serum qualitativ nicht gleichzusetzen ist, ist neuerdings in besonderem Zusammenhang von *Leendertz* betont worden. Er fand, daß das durch Gerinnung des Gesamtblutes gewonnene Serum um 0,17 bis 0,54 Proz. (im Mittel 0,27 Proz.) in seinem Eiweißgehalt geringer sei als das durch Gerinnung reinen Plasmas gewonnene Serum. Auf Grund dieses Befundes behauptet er, seien alle bisherigen Fibrinogenbestimmungen, die sich auf eine Differenzberechnung zwischen Eiweißgehalt des Plasmas und dem des nativen Serums aufbauten (*Winternitz* und andere), falsch, d. h. sie lieferten zu hohe Fibrinogenwerte, da der Serumwert als zu tief angenommen würde. Er baut auf dieser Folgerung eine neue Methode der Fibrinogenbestimmung auf, auf die ich weiter unten noch zurückzukommen habe. *Leendertz* erklärt seine Befunde durch die Annahme, daß während der Blutgerinnung aus den Blutkörperchen nicht-eiweißhaltige Flüssigkeit (im Mittel 3,13 Vol.-Proz. des Serums) ausgepreßt würden.

Demgegenüber fand *Starlinger* bei 48 Untersuchungen 22 mal den Eiweißwert des Plasmaserums (P. S.) > als den des Vollblutserums (V. B. S.), 14 mal dagegen das P. S. < V. B. S. Doch ergab auch in ersteren Fällen eine Messung des Restserums (V. B. S. nach Abheberung der ersten Serumprobe, bezeichnet als V. B. S. R.) niemals geringere Eiweißwerte als beim P. S., oft sogar höhere. Er schließt daraus, daß der Wassersalzeinstrom, den er auch für die Differenzen verantwortlich macht, „nicht immer nach einer Richtung erfolgt, also kaum seine Bedingungen in einer mechanischen Auspressung der Erythrocyten allein findet, sondern nach beiden Seiten

sich wenden kann, entsprechend der jeweiligen Störung des Gleichgewichts der Verhältnisse, die wir als Regulatoren osmotischer Vorgänge kennen". In seiner neuesten Veröffentlichung hält er diese Konzentrationserscheinungen der einzelnen Blutkomponenten für weniger wahrscheinlich, zieht vielmehr qualitative Strukturveränderungen der Eiweißkörper mit konsekutiver Verschiebung der spezifischen Refraktion als eher möglich in Betracht.

Ganz gleiche Befunde wie *Starlinger* erhebt *v. Frey*, also auch Differenzen im Eiweißwert, aber ganz regellos nach beiden Richtungen. Er macht die einwirkende CO_2-Spannung der Luft dafür verantwortlich, die er dadurch ausschaltet, daß er mittels eines paraffinierten Schlauches das aus der paraffinierten Kanüle strömende Blut gleich unter Paraffinum liquidum auffängt. Bei dieser Technik bekam er ganz gleichen Eiweißwert bei P. S. und bei V. B. S. Die Entgegnungen von *Leendertz* und *Gromelsky* richten sich gegen angebliche technische Fehler der beiden vorigen Autoren.

Diese Streitfrage schien mir einer Nachprüfung wert. Die oben erwähnte Tatsache, daß sich in der ersten Auspressungsphase ein geringer konzentriertes Serum fand als in späteren, schien mir zuerst die Richtigkeit der *Leendertz*schen Befunde als möglich erscheinen. Doch zeigten bald weitere Untersuchungen, daß sich seine Befunde nicht mit den meinen deckten. Unter Berücksichtigung meiner gewonnenen Erfahrungen ging ich unter möglichst exakter Versuchsanordnung an das Problem heran, mich genau an die *Leendertz*sche Technik haltend, sie nur in Einzelheiten noch erweiternd.

Die Versuchsweise sei kurz beschrieben. Venenpunktion mit dicker *Strauß*scher Nadel, die innen mit dünner fester Paraffinschicht überzogen war. Kurze Stauung ließ sich leider meist nicht vermeiden, dann unbenutzt Abfließenlassen von 20 ccm Blut. Jetzt Unterschieben von fünf Zentrifugiergläschen, von denen stets II und IV mit Paraffinschicht überzogen waren, so daß das später gewonnene Plasmaserum in der Zeit der Entnahme von nativem Serum eingerahmt war. Die Gläschen, die der Reihe nach als I bis V bezeichnet waren, wurden alle sofort mit Paraffinum liquidum überschichtet. Ein Versuch nach *v. Frey*, das Blut mittels paraffinierten Schläuchen sofort unter Paraffin zu leiten, ergab ganz gleiche Werte wie die übrigen Versuche, so daß diese Komplizierung als unnötig wieder fallen gelassen wurde. Gläschen II und IV wurden sofort etwa 5 Minuten in mittlerer Umdrehungszahl zentrifugiert, das abgesetzte Plasma mit paraffinierter Pipette abgehebert und in frische Gläschen gebracht. Nach sofortigem Überschichten mit Paraffin spontanes Gerinnenlassen des Plasmas. Innerhalb der ersten 3 Stunden war in allen Röhrchen reichlich Serum ausgepreßt, so daß nach Ablauf von 3 Stunden alle fünf Proben refraktometrisch untersucht waren. In den Mittagsstunden, also etwa 5 Stunden nach der Entnahme nochmalige Abheberung des Restserums von Gläschen I, III und V; bei einigen wurde abends, also nach 9 bis 11 Stunden, ein zweites Restserum zur Refraktion gewonnen. Die Tabelle III zeigt die Zusammenstellung einiger Untersuchungsreihen. In der letzten Reihe sind in Klammern die Zahlen der interferometrischen Kontrollmessung beigefügt, die die Gesetzmäßigkeit der Reihe bestätigen.

Tabelle III.

Refraktometrische Untersuchungen von Vollblutserum (V. B. S.) und Plasmaserum (P. S.).

Serumprobe	Ulc. manus		Ca. labii		Ulc. ventr.	Ulc. crur.	Osteomyel.	Ulc. ventr.	Ca. ventr.	(Interferom.)
	vorm.	nachm.	vorm.	nachm.	vorm.	vorm.	vorm.	vorm.	vorm.	
I V. B. S.	58,2	58,5	56,2	56,2	57,3	53,6	56,7	62,0	54,6	(1017)
II P. S.	58,3	58,5	56,5	—	57,4	53,7	58,9	61,4	54,7	(1020)
III V. B. S.	58,4	58,6	56,6	56,4	57,5	54,1	57,7	61,2	54,8	(1022)
IV P. S.	58,5	58,7	56,6	—	57,5	53,8	59,1	61,3	54,9	(1026)
V V. B. S.	58,6	58,8	56,5	56,5	57,7	54,1	58,1	61,4	55,1	(1029)
VI V. B. S. R_1 I	58,8	58,9	55,8	55,9	57,4	53,9	58,7	61,7	54,5	(1018)
VII V. B. S. R_1 III	59,0	58,8	56,4	56,3	57,8	54,0	59,3	61,5	54,6	(1020)
VIII V. B. S. R_1 V	59,1	58,8	57,1	56,3	58,1	54,2	59,1	61,3	55,0	(1024)
IX V. B. S. R_2 I	—	59,0	—	56,3	—	—	nachm. 59,1	—	—	—
X V. B. S. R_2 III	—	59,5	—	56,7	—	—	59,5	—	—	—
XI V. B. S. R_2 V	—	59,2	—	56,8	—	—	59,2	—	—	—
XII P. S. R. II	—	—	—	56,7	—	—	59,6	—	—	—
XIII P. S. R. IV	—	—	—	56,6	—	—	59,3	—	—	—

V. B. S. R_1 bedeutet die 2. Abheberung des Serumrestes vom Vollblut nach 5 Stunden, V. B. S. R_2 die 3. Abheberung vom 2. Rest des gleichen Blutkuchens nach 9—11 Stunden. P. S. R. zeigt die Restabheberung vom geronnenen Plasma an. Die Nachmittagsmessung wurde am gleichen Serum, das vormittags abgehebert war, vorgenommen.

Aus der Tabelle III ist sehr vieles herauszulesen, zunächst einmal, daß kaum eine Blutprobe mit der nächsten gleichen Eiweißwert aufweist (ähnliche Beobachtungen von *P. Hirsch* u. a.), so daß man wohl zu dem Schluß berechtigt ist, daß zwei auch dicht hintereinander entnommene Blutproben so weit in ihrem Konzentrationsgrad differieren, daß man lediglich aus groben Differenzen Rückschlüsse ziehen darf. Trotz aller Unterschiede weisen die Reihen aber eine große Gesetzmäßigkeit auf. Meistens zeigen die fünf Proben eine aufsteigende Konzentration, minimal schwankend um 0,3, maximal um 1,4 Pulfricheinheiten. In der vorletzten Reihe geht der Wert bis zur dritten Probe zurück, um dann wieder anzusteigen. Die Plasmaserumwerte fügen sich mit überraschender Genauigkeit in die Reihen ein. Das einzige Mal, wo sie im *Leendertz*schen Sinne aus der Reihe herausfallen, das ist in der drittletzten Reihe, fügen sie sich beim ersten wie beim zweiten

Restserum wieder exakt in die Reihe ein. Es ist daraus zu schließen, daß hier bei der ersten Abheberung des Vollblutserums gerade eine besonders gering konzentrierte Phase getroffen ist. Übrigens zeigt das auf dem Fibringerinnsel restlich verbliebene Plasmaserum (XII und XIII) am Nachmittag auch eine Konzentrationserhöhung gegenüber der Abheberung des Morgens. Daß in den einzelnen Reihen das eine Mal das erste Restserum höher, das andere Mal tiefer konzentriert erscheint als die erste Abheberung, kann uns nach den erworbenen Erfahrungen über die verschiedenen Auspressungsphasen nicht mehr wundernehmen. Das zweite Restserum des Nachmittags ist parallelgehend mit den früheren Befunden stets konzentrierter als das zuerst nach der Entnahme untersuchte.

Aus allem geht hervor, daß die Leendertzschen Befunde über ein höher konzentriertes Plasmaserum in keiner Weise ihre Bestätigung finden. Meine Ergebnisse schließen sich also ganz den Befunden von *Starlinger* und von *v. Frey* an, zeigen nur keine willkürlichen Schwankungen, sondern eine gute Gesetzmäßigkeit. Wodurch die meist ansteigende Konzentration in den Reihen zustande kommt, ist nicht klar zu ersehen. Wahrscheinlich spielt der abnehmende Gehalt an CO_2 bei noch so geringer vorhergehender Stauung eine Rolle. Möglich erscheint aber auch, daß nervöse Einflüsse auf dem Wege des Sympathicus einen Einfluß haben: Schmerzempfindung beim Einstich der dicken Kanüle, Nachlassen der Erregung beim sicheren Abströmen des Blutes, Wechsel in der Gefäßweite, Änderung des Strömungswiderstandes usw. Es spielt in dem Augenblick der Blutentnahme sicherlich eine unübersehbare Kette von Einflüssen eine Rolle, die auch *Kappis* und *Gerlach* kürzlich bei wechselnden Leucocytenzahlen zur Erklärung heranziehen.

Serumlabilität.

Ebenso schwierig zu deuten wie diese Konzentrationsdifferenzen bei den einzelnen Proben der Entnahme sind die Veränderungen des von der Luft abgeschlossenen Serums, über die oben schon gesprochen wurde. Es muß bei diesen letzteren Refraktionsänderungen der Gedanke von Starlinger u. a. von einer qualitativen Strukturveränderung der Serumeiweißkörper mit ins Auge gefaßt werden. Es sei hier ein Wort *W. Freys* zitiert: „Jeder, der mit Serum experimentiert hat, weiß, welch ein labiles Gebilde er unter den Händen hat". Die Labilität von Bluteiweiß wird von *Hirschfeld* und *Klinger* definiert als „die Fähigkeit, den Dispersitätsgrad zu ändern".

Die Bluteiweiße zerfallen bekanntlich in mehrere durch verschiedene Verfahren voneinander zu trennende Arten, die man hauptsächlich ihrem Salzfällungsvermögen nach in die drei Hauptgruppen der Albumine, der Globuline und des Fibrinogens zusammenfaßt. Die Albumine sollen nach

Reiss normalerweise etwa 20 bis 40 Proz., die Globuline etwa 60 bis 80 Proz. des Gesamteiweißes ausmachen. Das Fibrinogen wird beim Gesunden auf 0,45 bis 0,46 (*Winternitz*, *Nägeli*) berechnet. Die Befunde anderer Autoren stimmen im großen und ganzen damit überein.

Von diesen Eiweißen wird das Fibrinogen allgemein als das labilste angesehen — es fällt bekanntlich schon nach kurzem Verweilen außerhalb des Gefäßgebietes als Fibrin aus. Von den beiden anderen gilt das Globulin wieder für labiler als das Albumin. Bei pathologischen Prozessen, auf die später genau eingegangen wird, wissen wir, daß zu gewissen Zeiten im Blute eine starke Vermehrung der Globuline und des Fibrinogens und eine Verminderung der Albumine sich findet, zu anderen Zeiten soll das Verhältnis umgekehrt sein (*Berger*). Die Frage, wie diese Verschiebung der Eiweißfraktionen zustande kommt, ist noch gänzlich unbekannt. Die oben skizzierte Auffassung, daß die Eiweiße in Form von hydrophilen Kolloiden in dem Suspensionsmittel des Plasmas aufgeteilt sind, ist wohl die vorherrschende. Umstritten ist aber schon die Frage, ob diese Eiweißkörper als chemische Individualitäten streng voneinander zu trennen oder Modifikationen ein und desselben Eiweißkörpers sind.

Die meisten älteren Autoren stehen wohl auf dem Standpunkt einer strikten Unterscheidung jedes Eiweißkörpers, auch wenn sein genauer Aufbau nicht bekannt ist. Viele nehmen aber die Möglichkeit einer Überführung des einen in den anderen an. *Hammarsten*, *Rohrer*, *Rusznyak* glauben aber, daß sie stets noch durch ihr chemisch-physikalisches Verhalten (Löslichkeit, Fällbarkeit, Refraktion, Viskosität) gut charakterisiert sind. *Ruszczynski* meint aus aufgestellten Kurven, die aus Eiweißfällungen bei langsam steigendem Ammonsulfatzusatz hergeleitet sind, neben den Hauptfraktionen Zwischenglieder annehmen zu müssen, „deren Zugehörigkeit zwar durch Konvention definiert, aber nicht aus ihrer Natur heraus zwingend gefordert werden kann". Auch *Starlinger* nimmt Übergänge zwischen den einzelnen Eiweißfraktionen an. *Starke* glaubt durch Hitzekoagulation bei 75 bis 85° C aus Albumin koaguliertes Globulin hergestellt zu haben. *Moll* will aus salzfreiem, kristallisiertem Albumin nach vorheriger Alkalisierung mit Soda bei einstündiger Hitzewirkung von 60° zuerst die Bildung von Pseudoglobulin, dann von Euglobulin gesehen haben. Die Befunde werden von *Rusznyak* bestätigt und dahin erweitert, daß durch Erhitzung auf 42° und verdünnte Laugen Globuline in Albumin übergeführt werden können, bei höherer Temperatur dagegen durch konzentrierte Laugen, Säuren, Alkohol und andere Mittel umgekehrt Albumine in Globulin. *Ruppel* und Mitarbeiter berichten über die Umwandlung von Albumin in Euglobulin beim Lagern salzhaltiger Albuminlösungen. Eine fast quantitative Überführung erreichten sie bei Kochsalz oder Ammonsulfatzusatz (2 bis 3 Proz.) unter Einwirkung des elektrischen Stromes. *Gutzeit* hat beobachtet, daß sogar ohne Temperatureinflüsse oder sonstige eingreifende Maßnahmen Albuminlösungen bei längerem Stehen während des Dialysierens sich spontan in Globulin umwandeln können. Auch von *Joachim* und *Voß* wurden solche Umwandlungen in vitro beschrieben. (Gestützt von *Hurwitz* und *Meyer*.) Die Reagenzglasversuche sind zum Teil nicht unwidersprochen geblieben (*Hammarsten*, *Gibson*, *Pauli*). Außerdem sind die Bedingungen bei Überführung unter starker Hitzeeinwirkung kaum auf den Zustand des Lebenden übertragbar (*Berger*). Letzterer nimmt bei pathologischen Prozessen eine Vermehrung der einzelnen Eiweißfraktionen unabhängig voneinander an und deutet sie als zelluläre Phänomene. Als

extreme Vertreter des Gegenpols stellen *Herzfeld* und *Klinger* die Behauptung auf, daß die durch Fällung, Dialyse usw. trennbaren Bluteiweißkörper keine chemischen Individualitäten seien, sondern eine zusammenhängende Reihe von verschiedenem Dispersitätsgrad bildeten, deren einzelne Glieder schon in vivo ineinander übergingen. Diese Evolution beginne gesetzmäßig bei den niedrigst dispersen Teilchen der Fibrinogenstufe und führe über die Globuline und Albumine zu nicht mehr koagulierbaren Körpern. Die Überführung von einer Dispersitätsstufe in die andere sei abhängig von dem Grad der Adsorptionsfähigkeit der kolloidalen Teilchen einerseits — wiederum abhängig von dem Grad der gelösten Abbauprodukte an der Oberfläche der Teilchen — und dem Angebot an zellulären Abbauprodukten (Albumosen, Peptiden usw.) andererseits. Bei Überschreitung eines gewissen Grades an Adsorption dieser Stoffe soll eine Zerteilung der Körperchen vor sich gehen, also ein Übergang in einen höheren Dispersitätsgrad. Das Fibrinogen soll die „empfänglichste“ Oberfläche haben, weil es primär mit wenig Abbauprodukten beladen ist, weniger gut soll das Globulin adsorbieren, am schlechtesten das Albumin. Im Gefäßsystem sei nie ein Gleichgewicht, es herrsche ein fortwährendes Strömen, eine Bewegung aller Stufen in der Richtung auf die durch das Nierenfilter dialysierbaren niederen Bausteine des nicht mehr koagulablen Eiweißes. Diese Evolution gehe verschieden schnell vonstatten, je nach dem Grade der Abbauvorgänge (etwa beim Fieber) schneller. Die Theorie wird durch verschiedenste Experimente, die den Übergang von Fibrinogen in Globulin und von Globulin in Albumin erhärten sollen, zu stützen versucht.

Ohne zu den divergierenden Auffassungen hier Stellung zu nehmen, soll dieser Exkurs nur dartun, daß man bei den von mir gefundenen Differenzen im Eiweißgehalt des Serums während der verschiedenen Auspressungsphasen wie vor und nach längerem Abstehen auch an eine chemisch-physikalische Zustandsänderung, d. h. eine Änderung des Dispersitätsgrades denken muß, vorausgesetzt, daß diese Auffassungen sich auf die Dauer behaupten können. Noch schwieriger werden die Verhältnisse zu deuten, wenn man zu bestimmten Zwecken dem Blute Salze zusetzt. Das geschieht in der Hauptsache, um das Blut ungerinnbar zu machen. Vor dem Kriege war das Hirudin — ein Extrakt aus Blutegelköpfen — das souveräne Mittel, das in den minimalen Dosen seiner Verwendung chemisch und physikalisch angeblich keine Blutveränderungen verursachte (*Starlinger*). Da es leider nach dem Kriege nicht mehr hergestellt wird und auch Bemühungen im Ausland vergeblich waren, ist man auf alle möglichen Ersatzmittel angewiesen, die alle mehr oder weniger schwere Veränderungen im Blute hervorrufen. Dadurch ist eine exakte Plasmauntersuchung, unter anderem auch eine genaue Fibrinogenbestimmung sehr erschwert.

Neuerdings ist von der Firma Weiß in Wien, Wipplingerstr. 33, ein Melaninsäurepräparat als Ersatzmittel für Hirudin herausgebracht worden, das Novirudin (s. *Adler* und *Wiechowsky*), das als Substanz in Gläschen zu 1 g, wie auch für den Tierversuch in 1proz. Lösung empfohlen wird. Es ist ein schwarzes Pulver, das nur partiell in Wasser und im Serum löslich ist unter starker Braunfärbung der Flüssigkeiten. Die angegebene Dosis

von 0,1 Proz. in Substanz zum Blut zugesetzt, verhindert in der Tat die Gerinnung. Auch ist die Einwirkung auf die Viskosität verhältnismäßig gering: bei 0,166proz. wässeriger Lösung, die bei Annahme von 60 Vol.-Teilen Serum im Blute ungefähr der Konzentrationshöhe bei 0,1 Proz. Zusatz zum Gesamtblut entspräche, war die Viskositätssteigerung 1,04 gegenüber 1 Wasser. Leider ist aber die intensive Braunfärbung im Wasser wie im Serum auch nach längerem Zentrifugieren bei der Refraktion so störend, daß genaue Ablesungen im Refraktometer unmöglich sind, so daß sich das Präparat für meine Untersuchungen als unbrauchbar erwies.

Refraktometer und Viskosimeter.

Ehe ich mich den folgenden Versuchen zuwende, muß ich kurz auf die verwendeten Apparate und ihre Technik eingehen.

Neben dem mehrfach erwähnten *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer wurde das Viskosimeter von *Hess* benutzt, aus den Resultaten der beiden Apparate die Albumin-Globulinwerte nach der *Rohrer*schen Tabelle berechnet. Der *Hess*sche Viskositätsmesser ist nach den meisten Literaturangaben als der zuverlässigste angesehen und mußte schon deshalb benutzt werden, weil sich die Albumin-Globulinberechnung auf seinen Zahlen aufbaut. Auf die anderen Viskositätsapparate kann ich hier nicht eingehen, zur kurzen Orientierung verweise ich auf *Fr. Müller* im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Das *Hess*sche Viskosimeter mißt in zwei dünnen Glasröhren die innere Reibung der zu untersuchenden Flüssigkeit im Vergleich zu der des Wassers. Die gefundenen Zahlen drücken die Skalenteile aus, bis zu denen das Wasser gelaufen ist, wenn das Serum das zweite Rohr bis zur Marke 1 durchlaufen hat. Man bestimmt so nicht die absolute, sondern eine relative innere Reibung. Da die Blutsalze auf die innere Reibung nach *Hess* ohne Einfluß sind, so ist der viskosimetrische Serumwert so gut wie ganz vom Eiweißgehalt abhängig und kann für diesen als wichtiger indirekter Anhaltspunkt dienen (*Nägeli*).

Dem Apparat liegt das *Poiseuille*sche Gesetz zugrunde, welches kurz aussagt, daß bei gleichem Druck, gleicher Kapillarweite, gleicher Zeit die innere Reibung nur noch abhängt vom Reibungskoeffizienten der Flüssigkeit, die im umgekehrten Verhältnis zur durchlaufenen Länge der Kapillare steht. Da die Reibung zwischen den Flüssigkeitsteilchen gemessen werden soll, nicht die Reibung zwischen Flüssigkeit und Glaswand, ist zu fordern, daß nie die erste Messung, also bei trockener Kapillare notiert wird, sondern erst von der zweiten Messung an (*Reiß*, *Rohrer*), auch soll bei dem ersten Durchtreten des Serums durch die Meßkapillare eine teilweise Zertrümmerung von Kolloidstruktur stattfinden (*Schibig*). Ich habe stets drei bis sechs Messungen vorgenommen und davon den Mittelwert genommen. Der während des Nichtgebrauches in der Kapillare nach Vorschrift weilende Ammoniak wurde vor dem Gebrauch natürlich ausgeblasen. Kleine zurückbleibende Ammoniakreste sollen nach *Mayesima* und *Kagan* keine Fehlerquelle bedeuten. Ich konnte mich oft vom Gegenteil überzeugen und habe darum stets die erste Serumprobe entfernt und erst die zweite zur Messung benutzt. Temperaturschwankungen verändern den Wert, und zwar be Vollblut nach *Hess* um 0,8 Proz. des Wertes pro 1° C, bei Serum weniger

Bei der üblichen Zimmertemperatur zwischen 17 und 23° soll aber eine Umrechnung unnötig sein (*Hess*, *Kagan*), da diese kleinen Schwankungen im Bereich der Fehlerquelle liegen. *Rohrer* hält für Serum sogar zwischen 16 und 24° eine Umrechnung auf konstante Temperatur für überflüssig. Da die Temperaturen in unserem Laboratorium immer zwischen 17 und 20° C betrugen, habe ich demzufolge keine Umrechnungen vorgenommen. Viel größere Fehlerquellen liegen in der Handhabung der Technik verborgen. Kleinste Rauhigkeiten in einer der beiden Kapillaren durch Schmutzpartikelchen, Luftbläschen, verschiedene Länge der Flüssigkeitssäule, Tropfen im Verbindungsstück usw. beeinflussen die Werte erheblich. Es erscheint mir unerläßlich, daß man jeden Morgen vor dem Gebrauch eine Probebestimmung mit Aqua dest. macht, um sich von dem exakten Arbeiten des Apparats zu überzeugen. So einfach die grobe Technik ist, so schwierig ist die feine, und es ist die übereinstimmende Erfahrung aller Untersucher, daß der Apparat nur in der Hand des Geübten brauchbare Werte gibt. Einer der größten Nachteile an dem Instrument scheint mir zu sein, daß die Werte vom Saugungsdruck stark abhängig sind, der mittels eines Ballons manuell ausgeübt wird. *Drosbach* fand bei einem Druck von 150 mm z. B. für Blut ein η von 4,3, bei 10 mm Druck von 5,5, also eine Differenz von 20 Proz. Es ist allgemein betont, daß das *Poiseuille*sche Gesetz nur im Bereich kleiner und mittlerer Drucke seine Gültigkeit habe (*Kohlrausch*). Bei stärkerem Druck treten turbulente Bewegungen auf, die die Viskosität der beiden Vergleichsflüssigkeiten verschieden beeinflussen, und zwar soll die Einwirkung auf dünnflüssige Körper größer sein als auf zähflüssige, wodurch die relative Viskosität für Blut leicht als zu gering angegeben wird (*Bose*). Andererseits spielt bei zu geringem Druck die Kapillarität in den beiden Röhren eine nicht zu berechnende Rolle (*Determann*). Die Schwierigkeit, zwischen dieser Scylla und Charybdis sicher durchzukommen, scheint mir vielfach unterschätzt zu werden. Bei Reihenuntersuchungen, die man hintereinander machen kann, ist man vielleicht imstande, den Druck gleichmäßig zu gestalten; bei Untersuchungen, die sich über Wochen oder Monate hinstrecken, ist man es meines Erachtens nicht. *Kagan* hat darum schon vorgeschlagen, den Druck stets so zu gestalten, daß sich die Wassersäule in 2,5 Sekunden um einen großen Teilstrich fortbewegt, aber erstens ist es mühsam und auch schwierig, jede Messung mit der Uhr zu kontrollieren, zweitens scheint mir bei der angegebenen Zeit schon stark die Gefahr der Kapillaritätseinwirkung nahegerückt. Ich habe mich zu etwas rascherem Durchfließenlassen entschlossen, mich natürlich bemüht, den Druck möglichst gleich zu halten, kann mich aber des lästigen Gefühls nicht erwehren, daß bei dieser Messung für exakte wissenschaftliche Berechnungen eine zu starke subjektive Komponente mitspielt. Der Einbau eines fein funktionierenden Manometers würde meines Erachtens den Wert des Apparats heben.

Große Schwierigkeit macht die exakte Bestimmung der zweiten Dezimale, die für die Albumin-Globulinberechnung von so großer Bedeutung ist. Zur besseren Bestimmbarkeit derselben ist von *Hess* das sogenannte große Laboratoriumsmodell herausgebracht worden, das allein durch seinen Wassermantel zur Temperaturregulierung sicherlich Votreile besitzt. Mit diesem habe ich eine ganze Reihe von Untersuchungen ausgeführt, konnte mich aber entgegen der Meinung der meisten Autoren von seiner besseren Brauchbarkeit nicht überzeugen. Eine äußere Erschwerung — wenigstens bei dem mir zur Verfügung stehenden Modell — liegt in dem glatten Ab-

schluß der Untersuchungsröhre, die das Hineinbringen der Flüssigkeit gegenüber dem spitz ausgezogenen Ende des kleineren Typs sehr viel schwerer macht. Den Hauptnachteil fand ich aber in der viel stärker in Erscheinung tretenden Kapillaritätswirkung innerhalb der engeren Glasröhren. Es ist bei meinem Modell überhaupt kaum ein Stillstand der Flüssigkeitssäule zu erzielen; sie wird, auch ohne jeden Druck dauernd durch die Kapillarität in Bewegung gehalten. Darum habe ich mich bald wieder dem kleineren Modell zugewandt, das übrigens insofern eine Mittelstellung einnimmt, als die zur Blut- bzw. Serumuntersuchung bestimmte Kapillare drei große Teilstriche aufweist, während bei dem zuerst gebauten, das mir auch verschiedentlich zur Verfügung stand, nur zwei Teilstriche vorhanden sind, außerdem sind hier die Skalenteile für Wasser so eng gerückt, daß eine Bestimmung der zweiten Dezimale nur sehr aproximativ möglich ist. Allerdings mußten bei meinem mittleren Modell oft $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{3}$ der kleinen Teilstriche beobachtet werden, um bei der Umrechnung auf einen großen Teilstrich die zweite Dezimale einigermaßen genau zu bestimmen. Jedenfalls ist es absolut notwendig, bei Reihenuntersuchungen nur *einen* Apparat zu verwenden. Die Kontrolle der Werte beider Apparate zeigte, daß ganz erhebliche Differenzen vorlagen, und zwar gab das große Modell meist tiefere Werte an als das mittlere, obwohl natürlich bei Aqua dest. die Werte stets 1 : 1 waren. Die Tatsache allein beweist schon, daß derartige Messungen nur einen relativen Wert besitzen.

Der zweite der verwendeten Apparate ist das *Pulfrich*sche Eintauchrefraktometer, das von *Reiss* in die praktische Medizin für Eiweißbestimmung von Serum und Ex- und Transsudaten eingeführt worden ist. Es beruht auf einer Bestimmung des Lichtbrechungswinkels, der bei den einzelnen Substanzen verschieden ist. Die Refraktion von Gemischen läßt sich aber nach *Reiss* aus der spezifischen Refraktion der einzelnen Bestandteile entsprechend deren Prozentgehalt durch einfache Addition berechnen. Auf diesem Grundsatz baut die Eiweißbestimmung des Blutserums auf. Da der Eiweißgehalt achtmal so groß ist wie der Salzgehalt und 13mal so groß wie alle anderen anorganischen Substanzen, außerdem das Lichtbrechungsvermögen der im Serum vorkommenden Salze gering ist, mache sich selbst bei Verdopplung ihrer physiologischen Menge ihr Einfluß auf den Brechungswert nicht bemerkbar (*Nägeli*). Aus der abgelesenen Zahl der *Pulfrich*schen Einheiten nach Einstellen von 10 Minuten im Wasserbad von 17,5° C läßt sich auf einer beigegebenen Tabelle der prozentuale Eiweißgehalt leicht umrechnen. Die Methode ist einfach und rasch ausführbar, es genügen kleine Serummengen (2 Tropfen), und die Ablesung ist mit großer Exaktheit möglich. Der Ablesefehler beträgt nach *Reiss* 0,5 kleine Einheiten, das ist 0,01 Proz. Eiweiß, und dürfte in der Tat nicht höher sein. Vergleichende Refraktometerwerte unter sich werden mit 0,3 Proz. veranschlagt (*Reiss*). Bezüglich technischer Einzelheiten verweise ich auf die einschlägigen Arbeiten von *Reiss*. Wegen all dieser Vorzüge hat sich der Apparat rasch allenthalben durchgesetzt, aber es kann nicht verschwiegen werden, daß doch gewichtige Bedenken gegen seine Brauchbarkeit bestehen. Die Tatsache, daß bei allen anderen Eiweißbestimmungsmethoden niederere Werte gefunden werden als bei der Refraktion, sei kurz erwähnt. (0,5 bis 1,7 Proz.: *Chiary* und *Demanche*, bis zu 1,5 Proz.: *Berger* und *Petschacher*, bis zu 1,8 Proz.: *Schorer*.) Der Umstand wäre nicht wesentlich, wenn die Differenz einigermaßen gleich bliebe, was aber nicht der Fall ist, denn oft fand sich bei vergleichenden Methoden ganz exakte Übereinstimmung

(*Schorer*). *Reiss* selbst hat verschiedentlich die Refraktion für keine spezifische Eiweißbestimmung, sondern nur für eine Annäherungsberechnung angesprochen, die nicht ohne weiteres mit anderen Methoden vergleichbar sei; er hält diese aproximative Umrechnung aus dem Brechungskoeffizienten nur für den bequemsten und am leichtesten verständlichen Ausdruck für die Gesamtkonzentration, was ohne Frage der Fall ist. Für Urämie und Ikterus empfiehlt er z. B. wegen des Gehalts an verschiedenen stark lichtbrechenden Substanzen größte Vorsicht bei der Bewertung.

Es würde sich also jeder Streit erübrigen, wenn nicht *Rohrer* auf den vergleichenden Werten der Refraktometrie und Viskosität eine Methode der Albumin-Globulinberechnung aufgebaut hätte. Hierdurch ist der so genial erfundenen und praktisch äußerst brauchbaren Methode der aproximativen Eiweißkonzentrationsbestimmung der Schein wissenschaftlicher quantitativer Exaktheit untergeschoben worden, die ihr offenbar nicht zukommt. Durch Eintragung der Refraktometrie- und Viskositätswerte in ein Koordinatensystem hat *Rohrer* für reine Albumin-Globulinmischungen empirisch Kurven gefunden, die zu höheren Konzentrationswerten hin leicht divergieren, aber eine große Gesetzmäßigkeit aufweisen. Durch Notierung der bei der Serumuntersuchung gefundenen Werte für ϱ und η in dieses Kurvensystem wird ein Schnittpunkt gefunden, der auf einer der Kurven liegt, die den Mischungsgrad der Albumine und Globuline in genauen Prozentzahlen angibt.

Die Fehlerquelle soll nach *Rohrer* 2 bis 3 Proz. betragen, *Alder* schlägt sie aber schon auf 5 Proz. an. Beide halten das Viskosimeter für die größte Fehlerquelle, welcher Ansicht sich wohl jeder Untersucher anschließen wird. Bei Reihenuntersuchungen eines Tages mag die Fehlerquelle nicht höher als 5 Proz. sein, bei Untersuchungen, die sich über Wochen hinausziehen, ist es meines Erachtens aus oben angegebenen Gründen nicht möglich, so gleichmäßige Viskosimeterwerte zu erhalten, so daß ich den reinen Ablesefehler doch als höher als 5 Proz. veranschlagen muß. Die Ansicht *Rohrers*, daß beim *Heß*schen Viskosimeter die Fehlerquelle nur mit 0,01 Einheiten anzusetzen sei, kann ich nicht teilen.

Doch gewichtigere Bedenken als diese technische Ablesefehlerquelle sind in letzter Zeit von verschiedenen Autoren vorgebracht worden. Schon *Wanner*, *Schorer* und *Löhr* haben Bedenken gegen die Methode erhoben. *Schorer* schuldigt die Verschiedenheit des Brechungsexponenten bei verschiedenen Albumin-Globulingemischen für divergierende Werte an. Auch *Berger* und *Petschacher* betonen, daß der Brechungskoeffizient der Blutsalze praktisch nicht als unveränderlich anzusehen sei, und daß *Reiss* den Eiweißen, insbesondere dem Globulin ein zu geringes Brechungsvermögen zuschriebe. Doch wird allgemein der Fehler für die Nichteiweißkörper für geringer erachtet als der Eiweißfehler selbst. Das *Rohrer*sche Koordinatensystem ist nach künstlichen Albumin-Globulingemischen aufgestellt und bei gleichem Material von *Heyder* bestätigt. Schon *Schorer* meint, daß der Rückschluß auf das menschliche Serum gewagt sei. Doch wird allgemein bestätigt, daß bei physiologischen Seren gut übereinstimmende Werte gefunden wurden, daß jedoch bei pathologischen mit großer Regelmäßigkeit überhöhte Werte, und zwar nach *Berger* und *Petschacher* bis zu 43 Proz. überhöhte Globulinverhältniszahlen gefunden würden. Die beiden Autoren fanden bei 50 mit Doppelmethoden untersuchten Fällen 33mal eine Differenz von mehr als 20 Proz. gegenüber der chemischen Analyse. Auch *Gutzeit* kommt zu einer scharfen Kritik der Methode. Er hat sich reine

elektrolytfreie Albumin-Pseudoglobulin- und Euglobulinpräparate besorgt, und an diesen die *Rohrer*sche Tabelle nachgeprüft. Er fand zunächst, daß sich zwei Pseudoglobulinkurven von angeblich gleich zusammengesetzten Präparaten nicht decken, das gleiche fand sich bei zwei Euglobulinkurven. Wenn also schon so leicht physikalische Zustandsänderungen einträten, sei der Wert der Methode schon stark in Zweifel gestellt. Außerdem fand er die Kurven der Pseudoglobuline und Euglobuline stark auseinanderliegend, so daß die Kurve für die Gesamtglobuline in der Mitte liegen müßte. „Liegt bei einer Albumin-Globulinbestimmung ein Refraktionsviskositätswert nun z. B. zwischen der Kurve für die Gesamtglobuline nach *Rohrer* und derselben für das Euglobulin, so ist sein Abstand nach links bis zur Albuminkurve nicht allein vom Albumingehalt, sondern auch noch vom Euglobulin abhängig. Je mehr Pseudoglobulin ein Serum enthält im Verhältnis zum Euglobulin, desto weiter nach rechts würde bei gleichem Albumingehalt der Refraktionsviskositätswert im Koordinatensystem liegen und würde nach der *Rohrer*schen Bestimmung einen zu geringen Albuminwert vortäuschen. Man bekommt so bei Reihenuntersuchungen ein ganz irriges Bild über die Albumin-Globulinmischung, so daß bei gleichem Albumingehalt Vermehrungen der Pseudoglobulinkomponente als Albuminverminderung, Zunahme der Euglobulinfraktion als Albuminvermehrung imponiere."

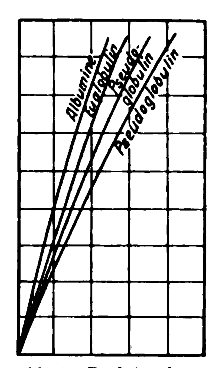


Abb. 1. Funktionskurve der Albumina, Pseudoglobuline u. Euglobuline nach Gutzeit.

Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß alle auf der *Rohrer*schen Berechnung aufbauenden Albumin-Globulinbestimmungen nur mit größter Vorsicht aufzunehmen sind, und auch unsere im klinischen Teil dieser Arbeit mit gleicher Methode aufgefundenen Werte sind nur mit gleichem Vorbehalt als Richtlinien, nicht als absolute Werte hinzunehmen.

Literatur.

Abderhalden, Pflügers Arch. **193**, 1922. — *Adam*, Zeitschr. f. klin. Med. **68**, 1909. — *Adler* und *Wiechowsky*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **92**. 1922. — *Alder*, Arch. f. klin. Med. **126**, 1918; Zeitschr. f. klin. Med. **88**, 1919; Fol. haematol. **25**, 1919. — *Bachmann*, Arch. f. klin. Med. **94**, 1908; Med. Klin. 1909, Nr. 36; 1910, Nr. 35. — *Bence*, Zeitschr. f. klin. Med. **58**, 1906. — *Bence* und *Koranyi* (s. d.). — *Berger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **28**, 1922. — *Berger* und *Petschacher*, ebendaselbst **36**, 1923. — *Berger* und *Dörr* (s. d.). — *Böhme*, Arch. f. klin. Med. **103**, 1911. — *Bogendörffer* und *Nonnenbruch*, ebendaselbst **133**, 1920. — *Bose*, Physik. Zeitschr. 1909, Nr. 1. — *Botazzi*, in *C. Neuberg*, Der Harn usw. Springer 1911. — *Chiary* und *Demanche*, zitiert nach *Schorer* (s. d.). — *Determann*, Die Viskosität usw. Monographie, Wiesbaden 1910, Zeitschr. f. klin. Med. **59**, 1906; Med. Klin. 1909, Nr. 24. — *Dörr* und *Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh. **93**. 1921. — *Drossbach*, Verh. d. 34. Kongr. f. inn. Med. 1922. — *Ewald*, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1877. — *W. Frey*, Kolloid-Zeitschr. **6**, 1909. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **148**, 1924. — *Frischberg*, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. **123**, 1913. — *Gerlach* und *Kappis* (s. d.). — *Gromelsky*, diese Zeitschr. **149**, 1924.

— *Gromelsky* und *Leendertz* (s. d.). — *Gutzeit*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **39**, 1924.; Arch. f. klin. Med. **143**, 1924. — *Hamburger*, Zeitschr. f. Biol. **28** (Neue Folge 10), 1891. — *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. 1907. — *Hasselbach* und *Warburg*, diese Zeitschr. **86**, 1918. — *Herzfeld* und *Klinger*, ebendaselbst **83**, 1917; **87**, 1918. — *Heß*, Arch. f. klin. Med. **94**, 1908; Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 32; 1921, Nr. 45. — *Heyder*, Inaug.-Diss. Tübingen 1915. — *Hirsch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**, 1914; Deutsch. med. Wochenschr. **31**, 1914; Fermentforsch. **1**, 1916; Fermentstudien. Jena 1917. — *Hirsch* und *Löwe*, Fermentforsch. **3**, 1920. — *Hirschfeld* und *Klinger*, Berl. klin. Wochenschr. 1914, Nr. 25. — *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und des Gewebes 1924. — *Jorns*, Med. Klin. **28**, 1909. — *Kagan*, Arch. f. klin. Med. **102**, 1911. — *Kappis* und *Gerlach*, Med. Klinik 1924, Nr. 30. — *Klinger* und *Herzfeld* (s. d.). — *Klinger* und *Hirschfeld* (s. d.). — *v. Koranyi* und *Bence*, Pflügers Arch. **110**, 1905. — *Kohlrausch*, Lehrb. d. prakt. Physik 1910. — *Kottmann*, Korr.-Bl. f. Schw. Ärzte 1907, Nr. 4. — *Lampé*, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Tl. 3, H. 1, 1921. — *Leendertz*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 16; Arch. f. klin. Med. **140**, 1922; diese Zeitschr. **150**, 1924; Deutsch. med. Wochenschr. 1924, S. 44. — *Leendertz* und *Gromelsky*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **94**, 1922. — *v. Limbeck*, Schmiedebergs Arch. **35**, 1895. — *v. Limbeck* und *Pick*, zitiert nach *Berger*. — *Löwe*, Physik. Zeitschr. **11**, 1910. — *Löwe* und *Hirsch* (s. d.). — *Mayesima*, Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **24**, 1912. — *Klothilde Meier*, Verh. d. 34. Kongr. f. inn. Med. 1922; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **29**, 1922. — *Moll*, Hofmeisters Beitr. **4**, 1904. — *Mukai*, Journ. of Physiol. **55**, 1921. — *W. Müller*, Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **21**, 1910; Zentr.-Bl. f. Chir. 1909, S. 41. — *Fr. Müller*, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. IV, Tl. 3, H. 1, 1921. — *Nägeli*, Blutkrankheiten und Blutdiagnostik 1923. — *Nonnenbruch* und *Bogendörffer* (s. d.). — *Petschacher* und *Berger* (s. d.). — *Pick* und *v. Limbeck* (s. d.). — *Pincussen*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **4**, 1, 1923. — *Poiseuille*, Ann. d. Chém. et de Phys. 1843, 3. Serie. — *Reiss*, Inaug.-Diss. Straßburg 1902; Hofmeisters Beitr. **4**, 1904; Jahrb. f. exper. Pathol. u. Pharm. **51**, 1904; Jahrb. f. Kinderheilk. **70**, 1909; Ergebn. d. inn. Med. **10**, 1913 (Monogr.); Arch. f. klin. Med. **117**, 1915; Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Tl. 3, H. 1, 1921. — *Rohrer*, Arch. f. klin. Med. **121**, 1917. — *Ruppel*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh. **97**, 1922. — *Ruszczynski*, diese Zeitschr. **152**, 1924. — *Rusznyak*, ebendaselbst **140**, 1923. — *Schibig*, Inaug.-Diss. Zürich 1913. — *Schorer*, Korr.-Bl. f. Schweiz. Ärzte **43**, 1913, Nr. 47. — *Schwenker*, Inaug.-Diss. Kiel 1911. — *Starlinger*, diese Zeitschr. **114**, **122**, **123**, 1921; **140**, 1923; **153**, 1924. — *Trump*, Jahrb. f. Kinderheilk. **73**, Erg.-Bd. — *Wanner*, Schweiz. med. Wochenschr. 1922, S. 32. — *Warburg* und *Hasselbach* (s. d.). — *Wiechowsky* und *Adler* (s. d.). — *Wiener*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**, 1912. — *Winternitz*, Arch. f. Dermatol. **99** und **101**, 1910.

Über die antiseptische Wirkung des Kupferchlorids in Lösungsmitteln verschiedener Dielektrizitätskonstante.

Von

N. Klissiunis.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. März 1925.)

Nachdem *W. Hellenbrand* und *G. Joachimoglu*[1]) nachgewiesen haben, daß das Sublimat in Lösungsmitteln niedriger Dielektrizitätskonstante (Chloroform, Benzol, Äther) keine antiseptische Wirkung zeigt, während in Lösungsmitteln mit hoher Dielektrizitätskonstante (Nitrobenzol, Glycerin, Wasser) eine starke antiseptische Wirkung entfaltet wird, lag es nahe, auch andere antiseptisch wirkende Stoffe aus der Reihe der Schwermetalle in der gleichen Richtung zu untersuchen. *Joachimoglu* und *Klissiunis*[2]) berichteten über Versuche mit Quecksilberbromid; auch hier zeigte sich, daß in Lösungen niedriger Dielektrizitätskonstante (Benzol, Äther) eine antiseptische Wirkung nicht nachweisbar ist, während in Lösungsmitteln mit hoher Dielektrizitätskonstante das Quecksilberbromid auf die Bakterien eine deutliche Wirkung ausübt.

Es war in diesen Versuchen auffallend, daß Chloroform, welches eine niedrige Dielektrizitätskonstante hat, die antiseptische Wirkung des Quecksilberbromids hervortreten läßt.

Die Versuche, über die ich im folgenden berichten werde, habe ich auf Veranlassung von Prof. *Joachimoglu* ausgeführt. Sie bilden eine Fortsetzung der oben erwähnten Arbeiten und sollen uns über die Frage unterrichten, ob auch das Kupferchlorid in Lösungen verschiedener Dielektrizitätskonstanten in bezug auf die antiseptische Wirkung ein verschiedenes Verhalten zeigt. Als Lösungsmittel wurden angewandt: Isoamylalkohol, Propylalkohol, Isopropylalkohol, Aceton, Äthylalkohol, Methylalkohol, Glykol, Glycerin und Wasser. Das benutzte Cuprichlorid war ein reines Präparat von *F. Kahlbaum* (zur

---

[1]) Diese Zeitschr. **158**, 131, 1924.

[2]) Ebendaselbst **153**, 136, 1924.

Analyse). Es wurden Lösungen entsprechend einer Konzentration von 1:50 benutzt. Die Herstellung der Lösungen machte keine Schwierigkeiten, da die Löslichkeit in den genannten Lösungsmitteln eine genügende ist. Beim Lösen des Cuprichlorids fällt auf, daß die Lösung in Isoamylalkohol, Propyl- und Isopropylalkohol, Aceton eine smaragdgrüne bis gelblichgrüne Färbung zeigt, während die Lösungen in Glykol und Glycerin eine hellgrüne Farbe zeigen, die der reinen blauen Färbung der wässerigen Lösung näher kommt. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die verschiedene Farbe dieser Lösungen durch die verschiedene Dissoziation des Cuprichlorids bedingt ist. In Wasser, Glycerin und Glykol sind bei gleichem Kupfergehalt mehr Cupriionen vorhanden als z. B. im Isoamylalkohol oder Propylalkohol.

Zur Prüfung der antiseptischen Wirkung haben wir zunächst Milzbrandbazillen angewandt. Die Wirkung des Cuprichlorids war jedoch sehr schwach. Es mußte eine Einwirkung von mehreren Tagen stattfinden, um eine antiseptische Wirkung nachzuweisen. Bessere Resultate haben wir mit einem nicht pathogenen Mikroorganismus, dem Bacillus Prodigiosus, bekommen. 24-Stunden-Schrägagarkultur von Prodigiosus wurde in 2 ccm Wasser aufgeschwemmt. In die Aufschwemmung brachten wir steile Glasperlen. Nach 5 Minuten wurden sie herausgenommen, zunächst bei 37° und dann im Exsikkator getrocknet. Die so vorbereiteten Glasperlen wurden dann für die Versuche verwendet. Ein Versuch mit einer Einwirkungsdauer von 5 Minuten ist in der Tabelle I wiedergegeben. Der Versuch zeigt, daß in Isoamyl-

Tabelle I.

	Einwirkungsdauer 5 Minuten		Dielektrizitätskonstante
	Abgelesen nach 48 Std.	Abgelesen nach 96 Std.	
1. Isoamylalkohol	+++	+++	5,7
Isoamylalkohol $CuCl_2$ 2:100	+++	+++	
2. Propylalkohol	++	++	22,47
Propylalkohol, $CuCl_2$ 2:100	+++	+++	
3. Isopropylalkohol	+++	+++	26
Isopropylalkohol, $CuCl_2$ . .	+++	+++	
4. Aceton	++++	++++	21,5
Aceton, $CuCl_2$ 2:100 . . .	++++	++++	
5. Äthylalkohol	++	+++	26,8
Äthylalkohol, $CuCl_2$ 2:100	—	+	
6. Methylalkohol	+	+	35,3
Methylalkohol, $CuCl_2$ 2:100	—	17 Kol.	
7. Glykol	++	++	41,2
Glykol, $CuCl_2$ 2:100 . . .	—	3 Kol.	
8. Glycerin	++++	++++	56
Glycerin, $CuCl_2$	++++	++++	
9. Wasser	++++	++++	81,1
Wasser, $CuCl_2$	—	—	

Propyl-, Isopropylalkohol und Aceton eine antiseptische Wirkung nicht vorhanden ist, während beim Äthyl-, Methylalkohol, Glykol und Wasser eine Einwirkung auf die Bakterien nachweisbar ist. In Glycerin ist eine antiseptische Wirkung nicht vorhanden. Wir haben in den früheren Versuchen mit Sublimat und Quecksilberbromid in Glycerin eine antiseptische Wirkung nachweisen können. Warum sich hier das Glycerin anders verhält, können wir nicht sagen. Da einige dieser Lösungsmittel antiseptisch wirken, so haben wir gleichzeitig auch das reine Lösungsmittel geprüft. Das gleiche Resultat zeigt der Versuch der Tabelle II. Berücksichtigt man die Dielektrizitätskonstante der Lösungsmittel, so zeigt auch das Cuprichlorid in Lösungsmitteln niedriger Dielektrizitätskonstante (Isoamylalkohol, Propylalkohol, Isopropylalkohol, Aceton) keine antiseptische Wirkung, während bei Lösungsmitteln mit hoher Dielektrizitätskonstante eine antiseptische Wirkung vorhanden ist. Daß in diesen Lösungsmitteln der Dissoziationsgrad ein stärkerer ist, unterliegt keinem Zweifel, und wir können auch hier die Regel aufstellen, daß die antiseptische Wirkung proportional dem Dissoziationsgrad ist. Nur Glycerin, welches eine hohe Dielektrizitätskonstante besitzt, zeigt eine Ausnahme. In diesem Lösungsmittel wirkt Cuprichlorid nicht antiseptisch.

Tabelle II.

	Einwirkungsdauer (Prodigiosus)			
	2 Std.		24 Std.	
	Abgelesen nach 18 Std.	Abgelesen nach 48 Std.	Abgelesen nach 18 Std.	Abgelesen nach 72 Std.
1. Isoamylalkohol $CuCl_2$ 2:100	+++	++++	—	7 Kol.
2. Propylalkohol $CuCl_2$ 2:100	++	++++	+	25 Kol.
3. Isopropylalkohol $CuCl_2$ 2:100	+++	++++	—	4 Kol.
4. Aceton $CuCl_2$ 2:100 . . .	++++	++++	3 Kol.	+
5. Äthylalkohol $CuCl_2$ 2:100 .	2 Kol.	75 Kol.	—	—
6. Methylalkohol $CuCl_2$ 2:100	—	—	—	—
7. Glykol $CuCl_2$ 2:100 . . .	—	—	—	—
8. Glycerin $CuCl_2$ 2:100 . .	+	+++	5 Kol.	+ (+)
9. Wasser $CuCl_2$ 2:100 . . .	—	—	—	—

Zusammenfassung.

Cuprichlorid in Isoamylalkohol, Propylalkohol, Isopropylalkohol und Aceton gelöst, zeigt keine antiseptische Wirkung, während in Äthylalkohol, Methylalkohol, Glykol und Wasser bei gleichem Kupfergehalt eine antiseptische Wirkung vorhanden ist.

Über die Jodaufnahme von Casein.

Von

Fritz Lieben und **Daniel Lászlo.**

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Universitätsinstituts in Wien.)

(Eingegangen am 30. März 1925.)

Das Interesse der Biochemiker für jodhaltiges Eiweiß war durch die Entdeckung *Baumanns*, daß Jod im Schilddrüseneiweiß enthalten ist, ferner die Auffindung der „Jodgorgosäure" durch *Drechsel* und des „Jodospongins" durch *Hundeshagen* stark angeregt worden und hat eine große Anzahl von Arbeiten über künstlich dargestellte Jodeiweißkörper gezeitigt, die wir bei *Oswald*[1]) zum großen Teile verzeichnet finden; die ältere Literatur, von *Böhm* und *Berg*[2]) angefangen, bringt *Kurajeff*[3]). Heute, nach der hochbedeutsamen Isolierung des *Thyroxins* durch *Kendall*, erscheint es wohl gerechtfertigt, sich auch dem Problem der künstlich jodierten Eiweißkörper wieder zuzuwenden, zumal ja die Fragen nach *Art und Ort der Bindung*, sowie nach der gebundenen Menge, noch weit von einer klaren, eindeutigen Beantwortung sind.

Das Casein z. B., mit dem sich die folgenden Versuche beschäftigen, hält *Blum*[4]) mit 7 bis 7,5 Proz. Jod für gesättigt, *Liebrecht*[5]) findet 5,7 Proz., *Oswald*[6]) 11,3 bis 13,5 Proz. Was den *Ort* der Bindung betrifft, so stimmt schon *Hofmeister*[7]) der „nicht abzuweisenden Vorstellung" zu, „daß der

---

[1]) *A. Oswald*, Hofmeisters Beitr. **3**, 391, 1903.

[2]) *Böhm* und *Berg*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **5**, 329.

[3]) *D. Kurajeff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 462, 1898.

[4]) *F. Blum*, ebendaselbst **26**, 298.

[5]) *A. Liebrecht*, Ber. d. deutsch. Chem. Ges. **30**, 1824.

[6]) *A. Oswald*, Hofmeisters Beitr. **3**, 514, 1903.

[7]) *F. Hofmeister*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 159, siehe besonders S. 167.

Eintritt festgebundenen Jods im Eiweißmolekül vorwiegend einer Jodsubstituierung des aromatischen Kernes entspricht". Er findet auch bei seinen Jodkörpern *Millons* und *Adamkievics* Reaktion negativ. Dagegen macht *Oswald*[1]) auf Grund des fast gleichen Jodgehalts von chemisch stark verschiedenen „Protalbumosen" und „Heteroalbumosen" (speziell was den Tyrosingehalt betrifft) die wichtige Bemerkung, „daß das Jod sich nicht ausschließlich, wenn überhaupt an das Tyrosin anlagert" und sich ebensowenig ausschließlich an dem „indolliefernden Komplex" verankert. Am Schlusse seiner zweiten Arbeit[2]) erwähnt er, daß neben Tyrosin noch ein anderer Körper (eventuell Phenylalanin?) imstande sei, Jod zu binden, daß das Jod aber ausschließlich oder vorwiegend in den aromatischen Kern tritt, so daß man im Falle der Verallgemeinerung dieser Befunde in der Jodierung ein einfaches Mittel hätte, sich bei den verschiedenen Eiweißkörpern über die quantitativen Verhältnisse der aromatischen Bausteine zu orientieren; auch *Blum*[3]) meint, seine Jodzahl sei danach angetan, einen wesentlichen Faktor in der Beurteilung der Natur eines Eiweißkörpers abzugeben. In einer Reihe weiterer Arbeiten[4]) gelang es *Oswald*, aus dem Jodalbacid, Jodglidin, Jodcasein, Gorgonin und Spongin *3,5 Dijodtyrosin* darzustellen. Es ist wichtig, daß das tyrosinhaltige Jodeigonnatrium *kein* Dijodtyrosin lieferte; aus dem Jodcasein wurde etwa 1 Proz. Dijodtyrosin gewonnen, i. e. 4 bis 5 Proz. des Gesamtjods, das sich bei *Oswald* auf 12 bis 13 Proz. belief und etwa $^1/_{10}$ des Tyrosins, dieses zu 4,5 Proz. angenommen. Letztere Zahl ist heute auf mindestens 6 Proz. zu erhöhen, so daß der als Dijodtyrosin gefundene Bruchteil unter $^1/_{14}$ herabsinkt. *Pauly*[5]) führte unter besonders vorsichtigen Bedingungen Jod in das Protamin *Sturin* ein; er nimmt an, daß ersteres mit *Histidin* reagiert, und zwar 4 Atome per Mol Histidin, und findet so zwischen Jod- und Histidingehalt (12,9 Proz.) eine befriedigende Übereinstimmung. In einer zweiten Arbeit[6]) meint *Pauly*, daß alle bisher künstlich erhaltenen Jodproteine *den größten Teil ihres Jods in lockerer Form enthielten*, Proteine mit fest gebundenem Jod mußten *rein weiß sein und dürften an kalte schweflige Säure kein Jod abgeben*; Tryptophan könne Jod *nicht* aufnehmen[7]).

Den oben erwähnten, wie wir glauben, sehr berechtigten Zweifel *Paulys* an der festen Bindung der künstlich dargestellten Proteine teilen *Blum* und *Strauss*[8]) nicht; sie unterscheiden zwischen locker gebundenem Jod am N und fest gebundenem am C. Das erstere sei durch Reduktion mittels SO_2 leicht zu entfernen und sei am Imidazolring des Histidins befestigt (es können aber auch andere aufnahmefähige Gruppen im Protein in Betracht kommen). Das Jod am C sei am Tyrosin, eventuell an den doppelten Bindungen des Histidins verankert. Um die aus den gefundenen

---

[1]) *A. Oswald*, Hofmeisters Beitr. **3**, 413, 1903.
[2]) Derselbe, ebendaselbst **3**, 521, 1903.
[3]) *F. Blum*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 294.
[4]) *A. Oswald*, ebendaselbst **70**, 310; **71**, 200; **72**, 374; **74**, 290; **75**, 353.
[5]) *H. Pauly*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **43**, 2243, s. S. 2260, 1910.
[6]) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**, 291, 1911.
[7]) Vgl. *A. Oswald*, ebendaselbst **73**, 128 (dagegen *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **6**, 276).
[8]) *F. Blum* und *E. Strauss*, ebendaselbst **112**, 111, 1920.

Jodwerten berechneten Werte für Histidin und Tyrosin mit den tatsächlich gefundenen, von denen sie durchweg bedeutend abweichen, in Übereinstimmung zu bringen, werden eine Reihe von Hypothesen aufgestellt, die uns nicht zu überzeugen vermögen. Das Schema S. 132 für die Jodierbarkeit des Histidins z. B. kann natürlich die Basis für eine Menge beliebiger Jodwerte vor und nach SO_2-Behandlung abgeben, die Basis für das Schema selbst aber erscheint uns nicht ausreichend gesichert. Beim Jodcasein speziell gebe es nur Jod am C, und zwar am Tyrosin, welch letzteres durch das Fehlen der Millonreaktion einwandfrei gezeigt sei (S. 123). Wir halten diesen Schluß für unzulässig, worauf wir später zurückkommen. Der Wert für das Jod im Joscasein: 7,51 Proz. wäre, für Tyrosin berechnet, zu klein, da Casein wahrscheinlich über 6 Proz. Tyrosin enthält, woraus sich mindestens 8,4 Proz. Jod berechnen würden.

Wir konnten aus der Literatur nach obigem nur entnehmen, daß Jod in stark schwankendem Verhältnis von Eiweißkörpern aufgenommen wird und daß für diese Aufnahme in erster Linie die aromatischen Bausteine in Betracht kommen. Eine eindeutige Beziehung zu bestimmten Bausteinen kann aus den bisherigen Angaben nicht entnommen werden. Nun haben sich unsere Kenntnisse über den Tyrosin- und Tryptophangehalt von Proteinen durch einige Arbeiten[1]) aus diesem Institut in letzter Zeit einigermaßen gefestigt, während wir über den Histidingehalt allerdings noch sehr unvollkommen orientiert sind. Trotzdem erschien es nicht aussichtslos, zu versuchen, für den Verlauf der Jodierung von Proteinen in ähnlicher Weise zu einer Regel zu gelangen, wie es der eine von uns für den Vorgang der Nitrierung[2]) von Proteinen unternommen hatte.

I. Methodik der Jodierung, Auswaschen der Jodkörper und Alkoholbehandlung.

Wir benutzten Casein (*Hammarsten*) und setzten das Jod nach dem Vorgang von *Oswald*[3]) in der Kälte zu. Nach einigen Vorversuchen gingen wir schließlich folgendermaßen vor. Casein wurde in n/10 NaOH gelöst, und zwar je 1 g Casein in je 9 ccm n/10 NaOH; nach vollkommener Lösung wurde unter Wasserkühlung n/10 J in KJ-Lösung allmählich zugesetzt — das Tempo des Zusatzes erwies sich als für die Jodaufnahme irrelevant — und die, je nach der zugesetzten Menge Jods hellgelbe oder braune Lösung eine Stunde mit fließendem Wasser gekühlt, sodann in einen Dialysierschlauch übergefüllt und dem Jod-

[1]) Siehe *O. Fürth*, diese Zeitschr. **146**, 259; *O. Fürth* und *Z. Dische*, ebendaselbst **146**, 275; *O. Fürth* und *A. Fischer*, ebendaselbst **154**, 1.
[2]) *F. Lieben*, diese Zeitschr. **145**, 535 und 555.
[3]) *A. Oswald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**, 351, 1915.

zusatz entsprechend länger oder kürzer gegen destilliertes Wasser dialysiert, das tunlichst oft erneuert wurde. Die Dialyse wird fortgesetzt, bis eine Probe des Dialysierwassers mit $AgNO_3$ keine wesentliche Trübung von Ag J mehr gibt.

Während der Dialyse bleibt die Reaktion gegen Lackmus ziemlich neutral; eine kleine Verschiebung nach der sauren Seite, gegen Ende der Dialyse, bewirkt mitunter die Ausfällung des Eiweißes, dann wird die Dialyse abgebrochen und wie unten weiter behandelt. Die Reaktion von vornherein stärker alkalisch zu machen, vermieden wir, um ein partielles Reagieren des Jods mit dem Alkaliüberschuß statt dem Eiweiß zu verhindern.

Der Inhalt des Dialysierschlauches wird dann entleert und mit wenigen Tropfen Essigsäure das jodierte Eiweiß gefällt. Der Niederschlag wird auf einem Faltenfilter filtriert und gründlich ausgewaschen. Das Filtrat darf nicht nur keine Reaktion auf J' mit $AgNO_3$, sondern auch keine wesentliche Reaktion auf Jod mit *Stärke* mehr geben, dazu braucht man bei Körpern mit höherem Jodgehalt mehrere Stunden. Mit der getrockneten Substanz kann nunmehr die Jodbestimmung vorgenommen werden. Wir bedienten uns des bequemen und genauen Verfahrens von *Blum* und *Gruetzner*[1]). Die so erhaltenen Körper sind unlöslich in allen Lösungsmitteln außer Alkalien, bis etwa 4 Proz. Jod farblos, von da an mit steigendem Jodgehalt, von gelb bis rotbraun gefärbt.

Vor allem war nun die Frage zu beantworten: hat das Jodaufnahmevermögen des Caseins bei einem bestimmten Jodgehalt eine Grenze, bzw. läßt sich das *überschüssige* Jod durch entsprechendes Auswaschen mit Wasser, Ausschütteln mit Alkohol, Umfällen, eventuell Behandeln mit Natriumsulfitlösung entfernen? Ferner: läßt sich, falls eine solche Grenze in der Tat nachzuweisen ist, der dort gefundene Jodgehalt mit dem Gehalt des Caseins an bestimmten aromatischen Bausteinen (Tyrosin, Tryptophan, Histidin) in eine zufriedenstellende Übereinstimmung bringen?

Bevor wir die Versuche anführen, die zur Beantwortung dieser Fragen angestellt wurden, möchten wir in einer Tabelle, die bei wechselndem Jodzusatz von je 5 g Casein aufgenommenen Mengen Jod, sowohl absolut als in Prozenten des Jodkörpers einerseits, des Zusatzes andererseits zusammenstellen. Die angeführten Jodkörper wurden in der oben beschriebenen Art dargestellt und gaben in feuchtem Zustande weder beim Auswaschen mit Wasser noch beim Schütteln mit Alkohol (s. unten) etwas von ihrem Jodgehalt ab.

---

[1]) *F. Blum* und *R. Gruetzner*, vgl. Abderhaldens biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 3, S. 836ff.

Tabelle I.

Nr.	a) Zusatz von Jod in		b) aufgenommene Menge in			c) = a) — b) *nicht* aufgenommene Menge
	ccm n/10 J in KJ	g	g	Proz. des Jodkörpers	Proz. des Zusatzes	g
1	15	0,19	0,05	1,0	26	0,14
2	20	0,25	0,08	1,7	32	0,17
3	50	0,63	0,15	2,9	22	0,48
			0,18	3,6	28	0,45
4	60	0,76	0,21	4,2	28	0,55
5	70	0,88	0,26	5,2	29	0,62
6	88	1,12	0,36	7,1	32	0,76
7	100	1,27	0,45	9,1	35	0,82
8	200	2,54	0,49	9,9	19	2,05
9	300	3,81	0,59	11,8	17	3,22
10	400	5,08	0,72	14,4	14	4,36

Wenn wir zunächst annehmen, daß die Auswaschung mit Wasser und die Ausschüttelung mit Alkohol als Gewähr dafür genügen, daß sich in obigen Jodkörpern kein *völlig lockeres* Jod mehr befindet, so zeigt die Tabelle deutlich, daß die Jodaufnahme mit dem Jodzusatz wächst, und zwar werden bis zum Zusatz von 100 ccm n/10 Lösung etwa 30 Proz. derselben aufgenommen, worauf eine allmähliche Abnahme der prozuentellen Aufnahme erfolgt. Wir sehen also das Bild eines Vorgangs, der als *Adsorption* gedeutet werden kann.

Die Daten dieser Tabelle hatten sich uns erst im Laufe unserer Arbeit ergeben, und auch im Besitze derselben mußte sich unser Hauptinteresse darauf lenken, festzustellen, ob zwischen der *Natur der Bindung* bei den niedrig und den höher jodierten Eiweißkörpern ein Unterschied bestehe, wie er zwischen deren Farbe besteht.

Wir benutzen zunächst die Reaktion mit $NaNO_2$ und verdünnter H_2SO_4[1]), welche J′ in sehr geringer Menge, z. B. in Mineralwässern als Jod abzuscheiden gestattet; der Nachweis erfolgt mit Stärke oder durch Ausschütteln der Lösung mit Chloroform, wo sich das freie Jod violett auflöst.

Es wurden z. B. 0,2 g Jodcasein in 5 ccm 10proz. NaOH gelöst, 3 ccm 5proz. $NaNO_2$ und 3 Tropfen Stärke zugesetzt und dann mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert; das so als J′ oder JO′ gelöste, *ursprünglich* „*freie*" Jod mußte wieder als freies Jod abgeschieden werden, während *organisch gebundenes* Jod nicht nachgewiesen werden sollte.

Es zeigte sich nun bei *allen* Jodcaseinen, die wir dargestellt hatten, eine *positive* Reaktion. Wir mußten jedoch bald die Reaktion als für unsere Zwecke wertlos erkennen, als wir sie an bekannten organischen Jodkörpern ausprobierten, die uns durch die Freundlichkeit von Prof. Dr. *M. Kohn* der Wiener Handelsakademie zur Verfügung gestellt

[1]) Vgl. *Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem., 12. Aufl., 1, 302.

worden waren. Es gaben nämlich sowohl Trijodphenol als p-Joddiphenyl, also Substanzen mit zweifellos fester organischer Bindung des Jods am C einen *positiven* Ausfall, Trijodanisol allerdings einen negativen.

Wir hatten inzwischen wahrgenommen, daß einige unserer anfangs dargestellten Jodkörper (die sich später als nicht genügend ausgewaschen herausstellten) an Alkohol sowie an Chloroform Jod abgaben. Wir hofften auf diesem Wege zu einer Grenze zwischen festem (chemisch) und weniger fest gebundenem Jod zu gelangen und unterzogen andere Jodcaseine in frisch hergestelltem, noch feuchtem Zustand einer durchschnittlich 40stündigen Schüttelung mit Alkohol, den wir, seiner Mischbarkeit mit Wasser wegen, dem $CHCl_3$ vorzogen. Wir gelangten zu folgenden Daten:

Nr.	Jodgehalt in Prozenten				
	der ursprünglichen Substanz	1. Ausschüttelung	2. Ausschüttelung	3. Ausschüttelung	4. Ausschüttelung
1	1,9—1,6	1,7	—	—	—
2	2,9—3,6	2,7, 3,1	3,1	—	—
3	4,0	3,7	3,5	—	—
4	9,4	8,1	7,1	7,1	8,6
5	20,4	12,2	11,8	11,8	—

Im Falle 4 und 5 hat der Alkohol eine beträchtliche Abnahme des Jods bewirkt, trotzdem bleibt der Jodgehalt der mit verschiedenem Zusatz dargestellten Körper *vollkommen verschieden*, und eine Wiederholung der Darstellung derselben mit besonderer Aufmerksamkeit auf ein gründliches Auswaschen mit *Wasser* führte direkt zu Jodzahlen, die mit den *nach* dem Ausschütteln erhaltenen übereinstimmten.

Das Ausschütteln mit Alkohol führt also bei den Jodcaseinen *nicht* zu einer bestimmten Grenze und half uns nur, die obige Tabelle I in der vorliegenden Form zu berichtigen.

II. Umfällen und Natriumsulfitbehandlung der Jodcaseine.

Das Bild ändert sich nun bedeutend, wenn wir dazu übergehen, die auf eben erwähntem Wege dargestellten Körper umzufällen, d. h. in etwa n/10 Na_2CO_3 zu lösen und dann mit verdünnter Essigsäure wieder auszufällen, und diesen Vorgang zu wiederholen, bis auch schon die *ersten* Tropfen des Filtrats keinerlei freies oder gebundenes Jod mehr enthalten (wir prüften auf letzteres mit Nitritlösung und Stärke). Wie die folgende Tabelle zeigt, bewirkt auch ein dreimaliges Umfällen mit eventuell noch anschließender Sulfitbehandlung (die Lösung wurde auf 5 Proz. Na_2SO_3 gebracht) bei den *niedrig* jodierten Körpern *keine wesentliche Herabsetzung des Jodwertes*. Erst beim Zusatz: 5 g Casein

: 90 ccm n/10 J senkt sich der Wert um etwa ½ Proz. Bei den folgenden Substanzen mit höherem Ausgangswert (letzterer ist hier meist höher als in Tabelle I, da auf vollständiges Auswaschen in diesem Falle nicht soviel Gewicht gelegt wurde) werden nun, wie ersichtlich, durch das Umfällen beträchtliche Jodmengen entfernt; man kommt schließlich jedesmal zu einem Jodkörper, dessen Jodwert durch weiteres Umfällen nicht mehr verändert wird, derselbe gibt dann auch an eine 5proz. Na_2SO_3-Lösung kein Jod mehr ab. Die Jodkörper dieser Art können wir als *Endprodukte* betrachten, sie enthalten wohl alle ein einheitliches und ziemlich *fest* gebundenes Jod, auch zeigen sie durchweg *rein weiße Farbe*, entsprechen also beiden Bedingungen, die *Pauly*[1] für „festgebundenes" Jod aufgestellt hat (s. die folgenden Hydrolysenversuche).

Tabelle II.

Nr.	Zu je 5 g Casein hinzugefügt: n/10 Jod ccm	entsprechender Wert nach Tab. 1	Ausgangsbestimmung Jod Proz.	1. Umfällung Jod Proz.	2. Umfällung Jod Proz.	3. Umfällung Jod Proz.	Nach Na_2SO_3 Behandlung Jod Proz.
1	50	3,6	4,1—3,7 weiß	3,7	3,9	—	3,7, nach Umfällung 3,4
2	70	5,2	5,9 hellgelb	4,7 weiß	4,9	5,1, 4,4	4,5
3	90	7,1	7,7 gelb *)	weiß	6,8, 6,4 weiß	—	7,1, 6,4
4	140	etwa 9,4	12,4 braun	hellgelb	7,9 weiß	7,4	7,7
5	250	„ 11,0	12,2 braun	„	fast weiß	9,0 rein weiß	8,3, 7,9
6	400	14,4	16,2*) braun	„	9,2, 9,6 fast weiß	9,4 rein weiß	—

*) Bestimmung nach Schüttelung mit Alkohol.

Betrachten wir nun die so erhaltenen „Endwerte" und vergleichen sie mit dem Zusatz an Jod, so sehen wir, daß der Verlauf der Jodaufnahme noch immer durch eine *Adsorption* befriedigend dargestellt werden kann:

Tabelle III.

Nr.	Endwert (im Mittel) Jod Proz.	Jodzusatz g	Aufgenommene Menge in g	Aufgenommene Menge in Proz. des Zusatzes
1	3,7	0,63	0,18	29
2	4,5	0,89	0,23	26
3	6,7	1,14	0,34	30
4	7,7	1,78	0,38	21
5	8,0	3,18	0,40	13
6	9,4	5,08	0,46	9

[1]) *H. Pauly*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**, 291. 1911.

Wenn wir nun fragen, ob ein Grenzwert (über den die Jodaufnahme nicht mehr hinausgeht) erreicht wurde, so sehen wir einerseits, daß von etwa 7 Proz. an die Jodwerte, fast unabhängig vom Zusatz, immer näher zusammenrücken (bei Steigerung des Zusatzes von 90 bis auf 400 ccm n/10 J steigt der Jodgehalt nur von 7 auf 9 Proz.). Dieser Tatsache könnten wir aber nur dann die Bedeutung einer chemischen Bindung an eine bestimmte Aminosäure beilegen, wenn 1. in den höheren Jodwerten bei steigendem Zusatz keinerlei „Gang" wahrzunehmen wäre und wenn 2. dieser „Grenzwert" auf den Jodwert einer bestimmten Aminosäure genügend genau stimmen sollte; die letztere Bedingung wäre für Tyrosin (8,4 Proz., s. oben) so ziemlich erfüllt. Man müßte dann annehmen, daß zunächst ein Drittel des Jods von Tyrosin, zwei Drittel auf Nebenreaktionen verbraucht wird; bei höherem Zusatz wäre schließlich das Tyrosin mit 2 J gesättigt und der Überschuß an Jod könnte nicht mehr aufgenommen werden. Nun steht aber an Stelle 3 (Tabelle III), wo noch 30 Proz. bzw. etwa ein Drittel des Zusatzes aufgenommen werden, der dazugehörige Jodwert (6,7 Proz.) beträchtlich unter dem Wert für Tyrosin, der in minimo 8,4 Proz. beträgt, und wenn dieser erreicht bzw. überschritten wird, ist wieder eine stöchiometrische Relation schwer vorstellbar. Ferner ist unleugbar ein steigender „Gang" in den Jodwerten ersichtlich, und diese Tatsache zusammen mit den folgenden Erfahrungen bei der Erprobung der Millonreaktion für unsere Frage und bei den Hydrolysenversuchen halten uns davon ab, aus der obigen Tabelle II einen Grenzwert mit spezieller chemischer Beziehung zum Tyrosin herauszulesen; eine zahlenmäßige Beziehung zu einer anderen in Betracht kommenden Aminosäure läßt sich schon gar nicht feststellen, zumal solange wir z. B. über den Histidingehalt des Caseins nicht verläßlich informiert sind. Auch bei Umfällen bzw. bei Sulfitbehandlung bis zur Herstellung *rein weißer Jodkörper, die bei diesen Vorgängen keinerlei Jod mehr abgeben, läßt sich eine spezielle chemische Bindung an eine bestimmte Aminosäure (am ehesten käme Tyrosin in Betracht) nicht einwandfrei nachweisen; der Verlauf der Jodaufnahme kann durch eine Adsorption an das Protein erklärt werden.*

III. Ausführung der Voisenetreaktion[1]) auf Tryptophan bei Jodcaseinen.

Wir wandten uns gleich zu Beginn dieser Arbeit den Beziehungen zwischen Jod und *einzelnen Aminosäuren* zu, d. h. wir verfolgten die für Tyrosin und Tryptophan ausgearbeiteten quantitativen Bestimmungsmethoden bei Jodcaseinen. Das Resultat dieser Versuche sei kurz mitgeteilt. Bei Anwendung des Tryptophanbestimmungsverfahrens nach

[1]) Vgl. *O. Fürth* und *Z. Dische*, diese Zeitschr. **146**, 275.

Fürth und *Dische* auf Jodeiweißkörper mußte man sich zunächst darüber klar sein, daß eine Abnahme oder ein Verschwinden der Farbreaktion sowohl auf einer chemischen Bindung von Jod an Tryptophan beruhen konnte (da ein eventuell entstandenes Jodtryptophan — s. *Pauly*. l. c. — die Reaktion wohl nicht mehr geben dürfte) als auch darauf. daß ein anderwärts adsorbiertes Jod einfach durch seine Gegenwart die sonst normale Reaktion stört. Zwischen diesen Alternativen hätte sich zugunsten der ersten nur dann mit großer Wahrscheinlichkeit entscheiden lassen können, wenn der Jodgehalt des Jodcaseins und die Menge verschwundenen Tryptophans durchweg in stöchiometrischen Verhältnissen gestanden wären.

Wir verwendeten je 2 ccm einer 5proz. Lösung des Jodproteins in 30 proz. NaOH; unsere Resultate waren die folgenden:

Tabelle IV.

	a	b	c	d	e = b — d	f
Nr.	Jodgehalt der Jodcaseine	Tryptophangehalt der Probe	Jodgehalt der Probe	Tryptophan nach Voisenetreaktion noch vorhanden	Tryptophan verschwunden	Tryptophan, das nach stöchiometrisch. Verh. (2J : 1Tr) hätte verschwinden sollen
	Proz.	g	g	g	g	g
1	1,2	0,0016 (Casein, à 1,7 Proz. Tryptoph.)	0,0011	0,0013	0,0003	0,0009
2	1,8	„	0,0017	0,0011	0,0005	0,0013
3	2,5	„	0,0027	0,0015	0,0001	0,0022
4	4,3	„	0,0040	0,0014	0,0002	0,0031
5	6,0	„	0,0055	0,0006	0,0010	0,0043
6	10,8 ?	„	0,0105	—	0,0016	0,0083

Wir sehen, daß die Reaktion von Nr. 1 bis 4 trotz steigenden Jodgehalts nur kleine Schwankungen erleidet, daß erst bei 6 Proz. Jod im Casein die Voisenetfarbe stark abnimmt, bei etwa 11 Proz. verschwunden ist. Der Punkt des *definitiven Verschwindens* der Voisenetfarbe wurde später als zwischen 7 und 9 Proz. Jod liegend festgestellt. [Die bei etwa 8 Proz. vorhandene Jodmenge (0,0057 g) ist dann drei- bis viermal größer als stöchiometrisch für das verschwundene Tryptophan (0,0016 g Casein à 1,7 Proz. Tryptophan) benötigt würde.]

Sicher greift also das Jod das Tryptophan des Caseins *zunächst* nicht an, eine Entscheidung zwischen den beiden obigen Alternativen ist aber offenbar aus dem Versuch *nicht* zu gewinnen, denn das Jod könnte ja zunächst andere Stellen absättigen und dann erst, sei es durch chemische Bindung, sei es durch bloße Gegenwart die Voisenetreaktion zerstören.

Gegen die Anwesenheit als völlig *freies* Jod spricht wohl, abgesehen von den oben erörterten, bei der Bereitung der Jodkörper angewendeten Kautelen, das Bestehenbleiben der charakteristischen roten *Vorfarbe* (*vor* Nitritzusatz) bei den Jodkörpern, die Casein selbst stets gibt [1]). Bei *direktem* Zusatz von freiem Jod zu Casein, *unmittelbar vor Anstellung der Reaktion*, tritt dieselbe jedoch *nicht* auf (auch in diesem letzteren Falle bleibt übrigens die Reaktion *nach* Nitritzusatz, wenn auch abgeschwächt, bestehen).

2 ccm einer 5proz. Caseinlösung werden erst bei Zusatz von 5 Tropfen n/10 J unkolorimetrierbar, bei 6 Tropfen ist die Reaktion erloschen. Auch hier ist die dann verbrauchte Jodmenge bedeutend größer als dem Tryptophangehalt des Caseins (1,7 Proz.) entspricht (etwa das Doppelte), es findet also auch hier wohl zunächst eine *Ablenkung* des Jods vom Tryptophan statt, wenn auch nicht in so hohem Maße, wie bei den urspsünglichen Jodkörpern (offenbar spielt der Zeitpunkt des Zusatzes dabei eine Rolle).

Auch *Blum* und *Strauss* (l. c., S. 133) betonen das Erhaltenbleiben der Tryptophanreaktion bei Unterbrechung der Jodierung nach Verschwinden der Millonreaktion (s. unten).

Es wurde ferner die Wirkung eines Jodzusatzes auf die Voisenetreaktion von *freiem Tryptophan* untersucht. Eine proportionale Abnahme der Farbe mit dem Jodzusatz war *nicht* wahrzunehmen, allerdings stimmte das *Erlöschen* der Reaktion mit dem erreichten stöchiometrischen Verhältnis überein. Trotzdem glauben wir auch hier nicht an eine chemische Reaktion zwischen Jod und Tryptophan (vgl. *Pauly*, l. c.), eher an eine katalytische Hemmung; doch läßt sich eine absolut sichere Entscheidung noch nicht treffen.

Bei Beobachtung der Wirkung des Jodzusatzes mittels der Farbenreaktion nach *Voisenet* kann also konstatiert werden, daß das Jod *zunächst* das Tryptophan nicht angreift, sondern erst nach Absättigung anderer Stellen dasselbe entweder chemisch bindet oder als mehr oder weniger fest adsorbiertes (jedenfalls aber *nicht völlig freies*) Jod die Farbenreaktion katalytisch zerstört.

IV. Ausführung der Millonschen Reaktion [2]) auf Tyrosin bei Jodcaseinen

Wir mußten uns nunmehr fragen, an welche Stellen der Eiweißmolekel das Jod *zunächst* herantritt (d. h. wo es bei den Jodkörpern unter 6 Proz. verankert ist). Hier kam in erster Linie das Tyrosin in Betracht, das nach der neuen Methode von *Fürth* und *Fischer* ziemlich verläßlich bestimmt werden kann. Es muß aber auch hier betont werden, daß *nur strengste Proportionalität zwischen Jodzusatz und Abklingen der Millonfarbe in allen Verhältnissen* eine *chemische* Bindung (in stöchiometrischen Proportionen) von Jod und Tyrosin sehr wahr-

---

[1]) Casein gibt, zum Unterschied von anderen Proteinen, bei Ansetzen der Reaktion nach *Voisenet* (s. *Fürth-Dische*, S. 294) schon nach Zufügen von Formaldehyd und konzentrierter HCl eine rotviolette Farbe, die durch den späteren Nitritzusatz bloß intensiver wird.

[2]) Vgl. *O. Fürth* und *A. Fischer*, diese Zeitschr. **154**, 1.

scheinlich (wenn auch nicht unbedingt gewiß) machen würde, daß aber bei Divergenzen von den stöchiometrischen Verhältnissen man das Abklingen der Millonfarbe ganz ebensogut auf bloße katalytische Störung der Reaktion durch anderwärts adsorbiertes Jod zurückführen kann. ***Ein Verschwinden der Millonreaktion bedeutet durchaus nicht unbedingt eine Substitution des Tyrosins.***

Unsere Resultate gibt die folgende Tabelle wieder (Technik der Methode s. die zitierte Arbeit):

Tabelle V.

Nr.	A	B	C	D	E	F (=C−E)	G
	Jodgehalt des Jodcaseins	Jodcasein in 10 ccm Lösung	Tyrosingehalt der Probe (Casein à 6 Proz. Tyrosin)	Jodgehalt der Probe	Tyrosin nach *Millon* noch vorhanden	Tyrosin verschwunden	Tyrosin, das hätte verschwinden sollen, 1 Tyr. : 2 J
	Proz.	g	g	g	g	g	g
1	1,2	0,073	0,0044	0,0009	0,0028	0,0016	0,0006
2	1,8	0,110	0,0066	0,0020	0,0027	0,0039	0,0014
3	2,5	0,101	0,0061	0,0025	0,0020	0,0041	0,0018
4	4,3	0,098	0,0059	0,0042	0,0017	0,0042	0,0030
5	5,2	0,041	0,0024	0,0021	0,0010	0,0014	0,0015
6	6,0	0,095	0,0057	0,0057	0,0013	0,0044	0,0041
7	9,4	0,051	0,0031	0,0048	0,0013	0,0018	0,0034
8	10,8	0,127	0,0076	0,0137	0,0010	0,0066	0,0097
9	11,5	0,097	0,0058	0,0112	0,0011	0,0047	0,0089

Wir sehen aus der Tabelle V, daß 1. *alle* Jodcaseine noch einen mehr oder minder starken *positiven* Millon geben, daß 2., wie der Vergleich der Kolonnen F und G ergibt, das Abklingen der Millonfarbe *nicht* mit dem Jodgehalt proportional geht. Bei Körpern mit niederem Jodgehalt ist die Abschwächung der Farbe zu stark, bei Körpern mit höherem Jodgehalt zu schwach, und zwar trifft dies unabhängig von der Darstellungsart des Jodkörpers zu. [Der Körper Nr. 7 (9,4 Proz.) wurde wiederholt umgefällt, bis er als „Endprodukt“ resultierte, die Körper Nr. 8 und 9 wurden nur mit Wasser und Alkohol behandelt.] Ein Schluß auf Jodbindung an Tyrosin läßt sich also nicht ziehen. Stöchiometrische Verhältnisse kommen keinesfalls in Betracht, wenn auch eine partielle Bindung vorkommen mag, für die die Existenz von Dijodtyrosin spricht und die Auffindung dieser Substanz, wenn auch in minimalen Mengen, im Jodcasein durch *Oswald*[1]).

Zusatz von *freiem* Jod zu reiner Tyrosinlösung schwächt den Millon ab, jedoch nur unbeträchtlich. Wir können aber auch hier nicht sagen, was

[1]) *A. Oswald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**, 290.

vorgegangen ist: chemische Bindung oder katalytische Hemmung; eine Proportionalität zwischen Jodzusatz und Farbeabschwächung besteht jedenfalls *nicht*.

Die angeführten Versuche lassen die Möglichkeit einer *partiellen* Bindung oder Anlagerung von Jod an Tyrosin offen, doch lassen sie keinerlei stöchiometrische Beziehungen erkennen.

V. Hydrolysenversuche.

Der Wunsch, uns über die Rolle bestimmter Aminosäuren bei der Jodierung zu informieren, veranlaßte uns schließlich, eine Reihe von Hydrolysenversuche anzusetzen. Es drängt sich z. B. die Frage auf, ob nach der durch Hydrolyse von Casein vollzogenen Zerstörung von Tryptophan das Hydrolysat Jod aufnehmen würde und ob die Aufnahme zu bestimmten Aminosäuren (Tyrosin, Histidin) in Beziehung gebracht werden könne. Es ergab sich in wiederholten Versuchen, daß nach der Hydrolyse mit 25 Proz. H_2SO_4 und Neutralisation der Säure mit Ätzbaryt das Filtrat nach Zerstörung des Tryptophans ganz deutlich Jod aufnimmt, aber viel weniger als dem Tyrosin- oder gar dem Tyrosin- + Histidingehalt des Caseins entspricht.

Ein Filtrat (entsprechend urspsünglich 2 g Casein) sollte verbrauchen für Tyrosin à 6 Proz.: 13,4 ccm n/10 J, für Histidin à 4 Proz. 8,6 ccm, Summe 22,0 ccm n/10 J; faktisch verbrauchte es: nach 10 Minuten einige Tropfen n/10 J, nach 20 Minuten 1 ccm n/10 J, nach Stehen über Nacht 5 ccm n/10 J, 10 ccm bleiben auch bei tagelangem Stehen unverbraucht.

Also auch hier ist keine quantitative Beziehung wahrzunehmen.

Bei Hydrolyse von *Jodcaseinen* ergab sich zunächst, als Körper mit 1,5 bis 2 Proz. J mit 25 Proz. H_2SO_4 hydrolysiert wurden und im Hydrolysat nach Neutralisierung mit Ätzbaryt (wie oben) das Jod nach *Blum* und *Gruetzner* bestimmt wurde, daß *die Hydrolyse den Jodwert nicht ändert*. Die Voisenetreaktion auf Tryptophan war negativ, was auf Zerstörung des Tryptophans hinweist, da ja Jodcasein von 2 Proz. (s. oben, Tabelle IV) noch ungeschwächten positiven Voisenet gibt. Eine weitere Aufnahme von Jod durch das Hydrolysatfiltrat fand *nicht* statt.

Als wir nun die Hydrolyse mit 25 Proz. H_2SO_4 auf Körper mit höherem Jodgehalt erstreckten, trat als neue Erscheinung eine *Sublimation von freiem Jod* in den Kühler auf, und zwar angefangen bei Körpern von etwa 4 Proz. Jod. Dabei sublimierte stets nur ein Teil des in dem Körper enthaltenen Jods, der Rest ließ sich in dem Hydrolysat nach Neutralisation und Eindampfen im Eisentiegel nach *Blum* und *Gruetzner* bestimmen. Das sublimierte, mit KJ-Lösung aus dem Kühler herausgespülte Jod gab, zusammen mit dem so gefundenen Jod des Rückstandes,

in befriedigender Übereinstimmung (s. die folgenden Beispiele) die Summe des in der eingewogenen Substanz enthaltenen Jods[1]).

Es war nun zu untersuchen, in welcher Form dieses restliche, *nicht frei gewordene Jod* vorhanden war; zu diesem Zwecke wurde das Hydrolysat mit $AgNO_3$ gefällt. Es fiel ein schwärzlicher Niederschlag, den wir zunächst als durch Melanoidine geschwärztes Jodsilber betrachteten, zumal der so (aus dem Faktor J/Ag J) berechnete Wert sich mit dem Wert des sublimierten Jods meist leidlich gut auf den Gesamtjodgehalt des Jodkörpers ergänzte. Trotzdem war fast stets eine kleine Diskrepanz vorhanden, und zwar war der Wert Jod, aus Ag J berechnet, *höher* als die Differenz: Gesamtjod minus sublimiertes Jod betrug. Diese Diskrepanz verschwand auch nicht, als wir denselben Vorgang bei einem Hydrolysat von reinem Casein vornahmen und den (sehr spärlichen) Niederschlag von Ag-Salzen irgendwelcher Aminosäuren, entsprechend umgerechnet, vom Ag-Salzgewicht der Jodcaseinhydrolysate abzogen; trotz dieser stets vorgenommenen Korrektur war der so berechnete Jodwert plus dem sublimierten Jod immer etwas höher als der nach *Blum-Gruetzner* in der ursprünglichen Substanz gefundene.

Es wurde schließlich auch in dem Silberniederschlag selbst eine Bestimmung nach *Blum-Gruetzner* versucht und tatsächlich *weniger* Jod gefunden als dem Faktor J/Ag J entsprochen hätte (in Übereinstimmung mit der Bestimmung in dem ungefällten, eingedampften Hydrolysat, bzw. mit der ursprünglichen Substanz). Es wurden z. B. in einem Hydrolysat von 2,68 g Jodsubstanz à etwa 7,5 Proz. Jod gefunden: 0,3324 g Ag-Salz minus 0,020 g (umgerechnete Korrektur) = 0,3124 g Ag-Salz.

0,3124 g als Ag J berechnet, geben . 0,169 g Jod, i e. 6,4 Proz. der Substanz,
es sublimierten . . . . . 0,048 g „ i. e. 1,7 „ „ „

0,217 g Jod, i. e. 8,1 Proz. der Substanz, statt 7,5 Proz.

Die direkte Bestimmung nach *Blum-Gruetzner* im *Ag-Salz* gab entsprechend umgerechnet: 0,140 g Jod, i. e. 5,5 Proz. der Substanz, 5,5 + 1,7 = **7,2 Proz.**

Der zunächst liegenden Annahme, daß das Jod in Substanzen von über 4 Proz. in zwei Formen auftrete, einer locker gebundenen, sublimierbaren und einer festeren, die durch Hydrolyse irgendwie in Ionenform übergehe, stand nun aber nicht nur die eben erwähnte kleine Diskrepanz

---

[1]) Um ein eventuelles Entweichen von Jod durch den Kühler zu verhindern, wurde eine Vorlage mit K J-Lösung mittels Glasrohr an den Kühler angeschaltet, doch fanden sich darin stets nur minimale Jodmengen. Es konnte sich außerdem noch Jod in den bei Filtration des Hydrolysats auf dem Filter verbleibenden Melanoidinen finden; daher wurde das Filter stets mit K J ausgewaschen, jedoch niemals bestimmbare Mengen freien Jods vorgefunden, auch eine Bestimmung nach *Blum-Gruetzner* (für gebundenes Jod) war negativ.

im Jodwert (als AgJ berechnet) im Wege, sondern auch die Tatsache, daß die Jodkörper über 4 Proz. J, die Sublimation zeigten, nicht etwa nur den Überschuß über 4 Proz. als frei in den Kühler abgaben, sondern meistens *bedeutend mehr*, und zwar hing dies von der Konzentration der verwendeten Säure ab. In dem obigen Beispiel waren *5 Proz.* H_2SO_4 verwendet worden; wurde aber dieselbe Gewichtsmenge (2,68 g) desselben Jodkörpers (à 7,5 Proz. Jod) mit *30 Proz.* H_2SO_4 behandelt, so sublimierten 6,2 Proz. in den Kühler und bei Verwendung von 25 Proz. H_2SO_4 war gewöhnlich ein ähnlicher Bruchteil als frei bestimmbar. Es erschien also nicht möglich, dem Wert von 4 Proz. eine besondere Bedeutung als Grenzwert zwischen fester und lockerer gebundenem Jod beizulegen. Würde man nun auch diese Grenze aufgeben und zunächst eine einheitliche Bindung annehmen, so wäre doch überhaupt noch nicht recht verständlich, wie die Säure ein irgendwie organisch verankertes Jod in Ionenform überführen sollte; eine partielle Reduktion von ursprünglich einheitlich adsorbiertem Jod zur Ionenform ist unvorstellbar, eher könnte man an eine partielle *Oxydation* des zunächst insgesamt in Ionenform übergeführten Jods zu freiem Jod denken, und zwar nach Maßgabe der Schwefelsäurekonzentration, wie es der oben erwähnte Versuch zeigt. Aber auch das ist ausgeschlossen, da bei Hydrolyse mit konzentriertem HCl gleichfalls Sublimation auftritt, wobei eine derartige Oxydation wohl kaum anzunehmen ist. Wir haben die reine Konzentrationswirkung der Säure vor uns, sowohl der Einfluß der Temperatur (Differenz der Siedepunkte von 5 Proz. und 30 Proz. H_2SO_4) als der Zeit[1]) ließ sich durch Versuche als irrelevant ausschalten. Je konzentrierter die Säure, um so größer war der sublimierte, um so kleiner der durch $AgNO_3$ fällbare Anteil. Wurde 40 proz. HCl angewendet, wobei dann der letzte Anteil natürlich nicht bestimmt werden konnte, so ergaben auch Jodkörper *unter 4 Proz.* Sublimation.

Z. B. sublimierten von einem Körper mit:

3,7 Proz. J . . . . 2,5 Proz.
1,6 „ J . . . . 0,3 „

Wir mußten so die Vorstellung von der Umwandlung von Jod in Ionenform fallen lassen und erklären uns die Erscheinungen folgendermaßen: Alles Jod befindet sich in ähnlicher, aber verschieden starker Bindung an Aminosäuren verankert; je nach der Säurekonzentration wird es in wechselnder Menge von dieser Bindung befreit, wobei dieser Vorgang um so leichter eintritt, je mehr Jod sich in dem Körper befindet. Wir müssen uns vorstellen, daß das Jod zunächst (beim ersten Zusatz) die festeren Bindungen aufsucht, bei weiterem Zusatz aber immer

---

[1]) Natürlich wurde die Hydrolyse stets bis zur völligen Desintegration durchgeführt, bei der 5proz. H_2SO_4 durch 80 Stunden.

lockerer verankert wird. Je konzentrierter die Säure, um so fester gebundenes Jod vermag sie loszulösen, worauf das losgelöste Jod sofort in den Kühler sublimiert. Ein gewisser Teil des Jods bleibt aber im Verband der Aminosäuren, und *diese Jodaminosäuren werden als Silbersalze gefällt.*

Um irgend eine Basis für eine Berechnung zu haben, wurde zunächst angenommen, daß zwei Atome Jod in ein Mol Tyrosin-Ag-Salz eintreten, *wobei aber nicht vorausgesetzt werden soll, daß dies die hauptsächliche oder gar einzige Bindungsmöglichkeit für Jod an die Aminosäuren darstellt; wir nehmen vielmehr, wie gesagt, an, daß es ihrer sehr viele verschiedenartige gibt.*

Tabelle VI.

	1	2	3	4	5		6		7		8	
Nr.	Jodgehalt nach *Bl.-Gr.*	Säure	Konz. der Säure	Dauer der Hydrolyse	Sublimiertes Jod		Gebundenes Jod als Ag J berechnet		Gebundenes Jod als Dijod-Tyrosin-Ag berechnet		Jod berechnet aus 1 minus 5	
	Proz.		Proz.	Stdn.	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g
1	1,2	H_2SO_4	25	48	—	—	—	—	—	—	—	—
2	1,6	HCl	40	10	0,3	0,010	—	—	—	—	1,3	0,054
3	1,7	H_2SO_4	25	30	—	—	1,8	0,062	1,6	0,054	1,7	0,059
4	3,6	H_2SO_4	25	32	—	—	3,8	0,126	3,2	0,106	3,6	0,119
5	3,6	HCl	40	10	2,5	0,052	—	—	—	—	1,1	0,075
6	4,2	H_2SO_4	25	24	2,5	0,085	1,8	0,058	1,6	0,050	1,6	0,050
7	5,2	H_2SO_4	25	24	2,3	0,090	—	—	—	—	2,9	0,110
8	6,0	H_2SO_4	25	24	4,0	0,061	2,0	0,029	1,8	0,026	2,0	0,028
9	7,5	H_2SO_4	30	24	6,2	0,165	2,5	0,068	2,2	0,060	1,3	0,036
10	7,5	H_2SO_4	5	80	1,7	0,048	6,4	0,169	5,5	0,147	5,8	0,154
11	9,1	H_2SO_4	25	23	6,9	0,240	—	—	—	—	2,2	0,078
12	9,1	HCl	40	12	7,6	0,057	—	—	—	—	1,5	0,110

Wir sehen, daß die Berechnungsart des Jodwertes der Silbersalze als Dijod-Tyrosinsilber (der Differenz: Gesamtwert nach *Blum-Gruetzner* minus eventuell sublimiertes Jod) mindestens ebensogut und vielfach besser entspricht, als wenn das Silbersalz als Ag J betrachtet wird. Die oben erwähnte Diskrepanz wird meist kleiner, bleibt allerdings in anderen Fällen (wie z. B. in 9) bestehen; hier muß erinnert werden, daß ja die Berechnung als Dijod-Tyrosin-Ag nur einen Notbehelf darstellt und daß die Silbersalze faktisch wohl eine mannigfaltig wechselnde, durchaus nicht einheitliche Zusammensetzung aufweisen dürften.

Nur die Tatsache, daß Körper unter 3,8 bis 4 Proz. Jod mit 25 Proz. H_2SO_4 keine Sublimation zeigen, während höher jodierte Körper mit *derselben* Säure bedeutend mehr als den Überschuß über 4 Proz. in den Kühler sublimieren, läßt sich auch durch unsere Vorstellungsart nicht

befriedigend erklären. Es wäre vorstellbar, daß in hochjodierten Körpern der größte Teil des Jods lockerer gebunden ist als das gesamte Jod in nieder jodierten Körpern.

Die Hydrolysenversuche deuten in keiner Weise auf einen Grenzwert hin, der fester und lockerer gebundenes Jod scheiden würde. Die obige Tabelle VI verdeutlicht diese Tatsache, die auch gegen eine spezielle, stöchiometrische Beziehung zwischen Jod- und Tyrosingehalt des Caseins spricht.

Zusammenfassung.

1. Es erwies sich als nicht möglich, den Verlauf der Jodierung des Caseins derart in eine Regel zu bringen, daß sich daraus eine stöchiometrische Beziehung zu einer oder mehreren Aminosäuren ergeben könnte.

2. Vielmehr läßt sich der Vorgang als *Adsorption* erklären, und zwar sowohl bei (zum Teil noch gefärbten) Jodcaseinen, die an Wasser und Alkohol kein Jod mehr abgeben, als bei solchen, die nach mehrfacher Umfällung aus verdünnter Na_2CO_3, eventuell 5 proz. Natriumsulfitlösung, kein Jod verlieren und rein weiße Farbe zeigen. Die in letzterem Falle trotz stark steigenden Zusatzes schließlich nur sehr langsam steigenden Jodwerte bewegen sich wohl um den Wert für Tyrosin (2 Jod : 1 Tyrosin), doch kann eine stöchiometrische Beziehung daraus weder für diese noch für eine andere Aminosäure abgeleitet werden.

3. Ebensowenig ergibt sich eine solche aus der Verfolgung des quantitativen Millonverfahrens für Tyrosin und der Voisenetbestimmungsmethode für Tryptophan bei Jodcaseinen.

4. Die Hydrolysenversuche zeigen, daß ein, je nach der Konzentration der verwendeten Säure, größerer oder kleinerer Teil des Jods in den Kühler sublimiert, während der Rest im Hydrolysat durch Silbernitrat gefällt werden kann. Dies läßt jedoch nicht etwa auf zweierlei Jodbindungen im Eiweiß schließen, wie ausführlich besprochen wird, sondern kann durch eine einheitliche, wenn auch verschieden starke Bindung des Jods an Aminosäuren erklärt werden; je mehr Jod zugesetzt wird, um so weniger fest wird es gebunden bzw. um so leichter kann es durch Säure (auch von geringer Konzentration) aus der Bindung befreit werden (worauf Sublimation erfolgen kann). Möglicherweise ist in hochjodierten Körpern der größte Teil des Jods lockerer gebunden, als das gesamte Jod in niedrig jodierten Körpern.

Wir beabsichtigen, unsere Untersuchungen auf das Verhalten von Jod gegenüber wasserlöslichen Proteinen (Albuminen) zu erstrecken.

Notiz über die Jodverteilung in Abbauprodukten der Schilddrüse.

Von

Nikolaus Abelles und Hans Popper.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitäts-instituts.)

(Eingegangen am 30. März 1925.)

Die Erforschung des physiologisch wirksamen Bestandteils der Schilddrüse hat bekanntlich in jüngster Zeit durch die Entdeckung des *Thyroxins* durch *Kendall* einen wesentlichen Fortschritt erfahren, insofern es diesem gelungen ist, eine physiologisch wirksame kristallisierte Substanz durch Alkaliabbau der Schilddrüse zu isolieren. Es ist aber noch nicht bekannt, ein wie großer Anteil des im Schilddrüseneiweiß enthaltenen Gesamtjods tatsächlich auf die Thyroxinfraktion entfällt, und es erscheint der Vorgang von *Redonnet*[1]), der einfach den Thyroxingehalt der Schilddrüse in der Weise festzustellen versuchte, daß er in dieser das Gesamtjod bestimmte und auf die Thyroxinformel berechnete, vorläufig in keiner Weise ausreichend begründet.

Andererseits ist bekannt, daß *Baumann*[2]) durch Zerkochen von Schilddrüse mit Säure und Extraktion des säureunlöslichen Rückstandes mit Alkohol eine bis zu einem gewissen Grade gleichfalls wirksame Substanz, das *Jodothyrin* isoliert hat, welches dezennienlang für den physiologisch wirksamen Bestandteil der Schilddrüse gegolten hat. *Fürth* ist der Meinung, daß das *Baumann*sche Jodothyrin in innigstem Zusammenhang mit dem Melanoidinen *Schmiedebergs* steht, welche Kondensationsprodukte zyklischer Verbindungen darstellen.

Wir haben es uns zur Aufgabe gemacht, festzustellen, ein wie großer Bruchteil der Gesamtmenge des Schilddrüsenjods einerseits im

---

[1]) *Tomas Alday Redonnet*, Chem. Centralbl. **1924**, II, 2535 (C. r. soc. de biol. **91**, 816–817. Madrid Fac. de med.).

[2]) *E. Baumann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 319, 481, 1895; **22**, 1, 1896; *E. Roos*, ebendaselbst **21**, 19, 1895; **22**, 18, 1896; **25**, 1, 242, 1898; **26**, 429, 1898.

*Baumann*schen Jodothyrin (Versuchsserie A), andererseits in jenen Fraktionen sich findet, die in den Alkaliabbauprodukten (in Anlehnung an den Vorgang nach *Kendall*) erhalten werden (Versuchsserie C). Es wurden zwei Versuche angeschlossen zur Feststellung des Jodgehalts, der durch Salzsäurehydrolyse aus Schilddrüsensubstanz gewonnenen Melanoidine.

Bei den Jodbestimmungen gingen wir nach dem von *Blum* und *Grützner*[1]) angegebenen Verfahren vor. Als Ausgangsmaterial diente uns ein gut entfettetes, getrocknetes und fein pulverisiertes tierisches Schilddrüsenpräparat, das wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. *Emil Lenk* verdanken.

A. Verfahren nach Baumann.

1. 10 g Schilddrüsenpräparat (Jodgehalt 0,25 Proz.) wurden 6 Stunden lang mit der vierfachen Menge 10proz. H_2SO_4 gekocht, dann in Eiswasser abgekühlt; der säureunlösliche Rückstand wurde gesammelt, getrocknet und das Jod bestimmt. Es fanden sich 8,64 bzw. 8,13 mg Jod, i. e. 34,5 bzw. 32,5, im Mittel **33,5 Proz.** des Gesamtjods. *Alle folgenden Prozentzahlen beziehen sich auf das Gesamtjod des Präparats.*

2. 10 g Schildrüsenpräparat (Jodgehalt 0,25 Proz.) wurden wie oben behandelt. Der Rückstand mit 95proz. Alkohol durch mehrmaliges Kochen extrahiert. Im Extrakte, welcher zum Zweck der Jodbestimmung eingedampft wurde, fanden sich 8,64 bzw. 8,08 mg Jod, i. e. 34,5 bzw. 32,3, im Mittel **33,4 Proz.** des Gesamtjods. Es wird also durch Alkohol der im säureunlöslichen Rückstande enthaltene Jodkörper *zur Gänze* extrahiert.

3. 5 g Schilddrüsenpräparat (Jodgehalt 0,217 Proz.) wurden nach *Baumann*, siehe A 2. behandelt, doch wurde zu H_2SO_4 1 g Formaldehyd zugesetzt. Die Extraktion mit Alkohol wurde im Soxhlet vorgenommen. Im Alkoholextrakt fanden sich 0,45 bzw. 0,51 mg Jod, i. e. 4,1 bzw. 4,7, im Mittel **4,4 Proz.** (Vgl. hingegen Versuch B, 2).

B. Jod in den Melanoidinen.

1. 10 g Schildrüsenpräparat (0,25 Proz. Jod) wurden in 100 ccm 20proz. HCl 48 Stunden hydrolysiert. Der Rückstand wurde gesammelt und wies einen Jodgehalt von 3,4 bzw. 3,4 mg Jod auf, was **13,6 Proz.** des Gesamtjods entspricht.

2. *Gortner* fand vermehrte Melanoidinbildung bei Zusatz von Formaldehyd zur Hydrolysenflüssigkeit. Wir wiederholten den obigen Versuch unter Beigabe von Formaldehyd (1 g) zur Hydrolysenflüssigkeit und fanden 5,2 bzw. 5,5 mg Jod, i. e. 20,8 bzw. 22, im Mittel **21,4 Proz.** des Gesamtjods. Es zeigt sich somit bei Zusatz von Formaldehyd eine *Vermehrung* des Jodgehalts dieser Fraktion um etwa 50 Proz., die also mit der Vermehrung der Melanoidine selbst parallel zu gehen scheint.

---

[1]) *Blum* und *Grützner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 429; **91**, 392; vgl. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. 1, **3**, 836ff.

Es entsteht aus der in der Drüse enthaltenen physiologisch wirksamen Substanz, welche dem Tryptophan nahesteht, durch Zerkochen mit Säure ein Kondensationsprodukt, *Baumanns* Jodothyrin, das die Wirksamkeit bis zu einem gewissen Grade bewahrt hat. Nach der Meinung von *Fürth* ist das Jodothyrin nichts anderes als ein Zwischenprodukt zwischen der in der Drüse enthaltenen physiologisch wirksamen Substanz und den Melanoidinen. Nun wird die Melanoidinbildung durch Formaldehyd verstärkt, wobei der sonst alkoholextrahierbare Anteil. das Jodothyrin, offenbar schneller in Melanoidine übergeführt wird und daher durch Alkohol nicht mehr extrahiert werden kann (Versuch A, 3.).

C. Alkalihydrolyse.

1. 10 g Schilddrüsenpräparat (0,25 Proz. Jod) wurden durch kurzdauerndes Erwärmen in etwa 220 ccm 5proz. NaOH gelöst, durch Filtrieren über Glaswolle von den unlöslichen Bestandteilen befreit und durch H_2SO_4 neutralisiert. Nun wird kurz aufgekocht, der Niederschlag gesammelt, wobei das bei der Neutralisation gebildete Na_2SO_4 durch Nachwaschen gelöst wird, und das Jod bestimmt. Es finden sich 7 bzw. 7,3 mg Jod, i. e. 28 bzw. 29, im Mittel **28,5 Proz.** des Gesamtjods.

2. Wie oben; doch wurden zur Lösung statt 5 proz., 10 proz. Lauge verwendet. Die Jodbestimmung ergibt 5,1 bzw. 5,3 mg Jod, i. e. 20,5 bzw. 21, im Mittel **20,7 Proz.** des Gesamtjods.

3. Wie oben, doch wurden zur Lösung statt 5 proz., 30 proz. Lauge verwendet. Die Jodbestimmung ergibt 4,7 mg Jod, i. e. **18,8 Proz.** des Gesamtjods.

4. Der Niederschlag im Versuch C, 1. wird durch salzsäurehaltigen Alkohol (5 Proz. HCl) extrahiert. Der alkoholische Extrakt wird eingegedampft und auf Jod geprüft. Es finden sich 4,1 bzw. 4,9 mg Jod, i. e. 18 bzw. 19,6, im Mittel **18,8 Proz.** des Gesamtjods, also mehr als die Hälfte des in der Fällung des Versuchs enthaltenen Jods (28,5 Proz.).

5. Der Niederschlag im Versuch C, 1. wird durch alkoholische Natronlauge (5 Proz. NaOH) extrahiert. Der alkoholische Extrakt wird eingedampft und auf Jod geprüft. Es finden sich 7 bzw. 6,4 mg Jod, i. e. 28 (25,5), im Mittel **26,7 Proz.** des Gesamtjods. Durch alkoholische Lauge wird somit fast die Gesamtmenge des Jods im Niederschlag extrahiert.

6a. Der Niederschlag im Versuch C, 2. wird entsprechend dem Vorgang *Baumanns* 6 Stunden in 10proz. H_2SO_4 gekocht und der säureunlösliche Rückstand mit Alkohol extrahiert (*Soxhlet*). Im eingedampften Extrakt fanden sich 3 mg Jod, was **12 Proz.** des Gesamtjods der Schilddrüse bzw. etwa 60 Proz. des im Niederschlag vorhandenen Jods entspricht (20,7 Proz.).

6b. Das Filtrat im Versuche C, 2. wird eingedampft und ebenfalls nach *Baumann* behandelt. Im alkoholischen Extrakte fanden sich nur Spuren von Jod.

Die zwei letzten Versuche zeigen, daß zwischen Jodothyrin und Thyroxin ein gewisser Zusammenhang besteht, wie er ja von vornherein zu erwarten war. Es ergibt sich nämlich, daß aus dem Nieder-

schlag der ersten Teilfraktion nach *Kendall* noch eine Substanz nach derselben Methode gewonnen werden kann, wie das Jodothyrin aus der Drüse selbst. Aus dem Filtrat dagegen läßt sich dies nicht mehr erzielen.

Aus den vorliegenden Versuchen dürfte hervorgehen, daß sowohl bei Behandlung von Schilddrüsensubstanz nach *Baumann* als auch schon bei den ersten Stadien des Vorgangs nach *Kendall* in den betreffenden Fraktionen nicht etwa die gesamte in der Schilddrüse enthaltene Jodmenge, sondern nur *ein Bruchteil*, bestenfalls ein *Drittel des Jods* enthalten ist.

Zur Kenntnis des Ablaufs der Harnsäureoxydation durch Jod.

Von

Wilhelmine Elisabeth Fürth.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 30. März 1925.)

I.

Trotzdem die Harnsäureoxydation durch Jod schon seit mehr als einem halben Jahrhundert bekannt und vielfach studiert worden ist, lauten die Angaben über die Art der sich dabei abspielenden Reaktionen auch heute noch im höchsten Grade widersprechend, derart, daß es zurzeit unmöglich ist, sich auch nur ein annäherndes Bild über die eigentliche Natur dieses chemischen Vorganges zu bilden. Es erscheint dies begreiflich, wenn man in Betracht zieht, daß das *Ausmaß des Jodverbrauchs durch Harnsäure* je nach den Versuchsbedingungen innerhalb weiter Grenzen schwankt.

Der erste Untersucher auf diesem Gebiet, *M. Huppert*[1]), der die Reaktion zwischen Jod und Harnsäure in alkalischen Phosphatlösungen sich abspielen ließ, nahm an, daß 1 Molekül Harnsäure 2 Atome Jod zu binden vermag. Die gleiche Relation hat auch *Ronchèse*[2]) festgestellt, als er die Reaktion in schwach alkalischen Medien (Borax, Ammonium- oder Kaliumbicarbonat) vor sich gehen ließ. Schon früher war bei einer im Laboratorium *Adolf Liebens* von *Bryk*[3]) ausgeführten Untersuchung den diskutierten Umsatzgleichungen (s. unten) die gleiche Relation zugrunde gelegt worden, die übrigens annähernd auch bei den Beobachtungen von *A. Jolles*[4]) sowie von *D. Vitali*[5]) wiederkehrt. Das ist nun nicht etwa so zu verstehen, daß in allen jenen Fällen, wo freies Jod zu einer Harnsäurelösung zugefügt worden ist, die Aufnahme wirklich genau 2 Atome Jod pro Molekül Harnsäure betragen hätte. Vielmehr schwanken die Beobachtungen verschiedener Autoren innerhalb ziemlich weiter Grenzen (1½ bis 2½ Atome Jod pro Molekül Harnsäure). *J. More*[6]) fand jüngst, wenn er bicarbonathaltige

---

1) *M. Huppert*, Arch. f. Heilk. **5**, 325, 1864.
2) *A. Ronchèse*, C. r. soc. de biol. **1906**, S. 504.
3) *E. Bryk*, Monatsh. f. Chem. **15**, 519, 1894.
4) *A. Jolles*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**, 193, 1900.
5) *D. Vitali*, Boll. chim. farm. **37**, 65; Chem. Centralbl. **1898**, I, 665.
6) *J. More*, C. r. de l'Acad. **178**, 498, 1924; Ber. f. d. ges. Physiol. **25**, 153.

Uratlösung mit einem Jodüberschuß versetzte und nach Ablauf von 5 Minuten ansäuerte und zurücktitrierte, einen Verbrauch von 2½ Atomen Jod auf 1 Molekül Harnsäure.

Anders, viel weitgehender und regelmäßiger scheinen die Reaktionen zu sein, die sich vollziehen, wenn man das Jod nicht im *fertigem* Zustande, vielmehr *in statu nascendi* einwirken läßt.

Wie seinerzeit *J. Kreidl*[1]) in *Adolf Liebens* Laboratorium festgestellt hat, vollzieht sich die Einwirkung von *Jod in statu nascendi* in ganz anderer und viel *eingreifenderer* Weise, als wenn das Jod in *fertigem Zustande* zugesetzt wird. Wurde einer Harnsäurelösung ein Überschuß von Kalilauge zugefügt, nunmehr titrierte Jodlösung bis zum Eintritt einer Gelbfärbung zugesetzt, sodann sofort mit Salzsäure angesäuert und mit Thiosulfat in üblicher Weise zurücktitriert, so ergab sich, daß 1 Molekül Harnsäure im Mittel 3,5 Atome Jod verbraucht. Der Autor äußerte sich dahin, daß man auf diese Weise die kleinsten Mengen Harnsäure titrimetrisch bestimmen könne.

Basierend auf dieser Feststellung, haben tatsächlich *O. Fürth*, *Josepha Urbach* und *Paul Wermer*[2]) ein jodometrisches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure im Harne ausgearbeitet. Dabei wird die Harnsäure als Ammoniumurat gefällt (nach dem Vorgang von *Cohen-Tervaert*), mit Hilfe der Zentrifuge abgetrennt und sodann nach dem Vorgang von *J. Kreidl* titriert. Zahlreiche Bestimmungen ergaben für kleine Harnsäuremengen (0,006 bis 0,010 g) sehr regelmäßig einen effektiven Jodverbrauch von 3,35 bis 3,82, im Mittel 3,58 Atome Jod pro Molekül Harnsäure, derart, daß man tatsächlich den Eindruck gewinnt, daß die Reaktion *einem definierten Endzustande zustrebt.*

Über die bei der Jodoxydation der Harnsäure sich vollziehenden chemischen Vorgänge sind die Angaben höchst spärlich und widersprechend.

Bryk (l. c.) hat für die Aufnahme von 2 Atomen Jod pro Molekül Harnsäure die Formulierung $2\,KOH + J_2 = 2\,KJ + H_2O + O$, $C_5H_4N_4O_3 + H_2O + O = C_4H_6N_4O_3 + CO_2$ versucht. Dabei müßte also ein Molekül Harnsäure glatt in je ein Molekül *Allantoin* und ein Molekül *Kohlensäure* zerfallen. Die erzielten Ausbeuten betrugen aber tatsächlich weniger als die Hälfte.

Völlig abweichend ist wiederum die Formulierung von *Vitali* (l. c.)

$$C_5H_4N_4O_3 + 2\,J + 2\,H_2O = CO\!<\!\begin{matrix}NH_2\\NH_2\end{matrix} + CO\!\begin{matrix}\diagup NH-CO\\ \qquad\quad |\\ \qquad\quad CO\\ \qquad\quad |\\ \diagdown NH-CO\end{matrix} + 2\,HJ$$

wobei es sich angeblich um einen glatten Zerfall zu *Harnstoff* und *Alloxan* handelt.

[1]) *J. Kreidl*, Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. **102**, IIb, 93. Wien 1893.
[2]) *O. Fürth, J. Urbach* und *P. Wermer*, diese Zeitschr. **141**, 236, 1923.

Daß in Wirklichkeit die sich hier abspielenden Vorgänge (abgesehen von dem diametralen Widerspruch zwischen den Angaben der beiden letztgenannten Autoren) um sehr vieles komplizierter sind, ist aus den eingehenden Untersuchungen von *J. More* (l. c.) klar zu ersehen. Dieser nimmt an, daß bei Aufnahme von 2 Atomen Jod pro Molekül Harnsäure in bicarbonathaltiger Lösung die Harnsäure zunächst in einen Zwischenkörper verwandelt werde, der sich durch Essigsäure zu *Allantoin* abbauen läßt, in bicarbonathaltiger Lösung aber unter anderem *Oxalsäureureïd* gibt. Bei Oxydation in stärker alkalischer Lösung soll dagegen unter komplizierten Umsetzungen neben verschiedenen Ureïden die Verbindung

```
    NH—C=N—CO—NH2
CO<    |
    NH—CO
```

das *Amid der Allantoxansäure*

```
    NH—C=N—COOH
CO<    |
    NH—CO
```

als labiles Zwischenprodukt auftreten.

Welcher Natur nun immer diese labilen Zwischenprodukte sein mögen, so ist anscheinend die Frage bisher gänzlich unbeantwortet geblieben, welchem *Zustande die maximale Harnsäureoxydation durch Jod nach J. Kreidl unter Aufnahme von etwa 3½ Atomen Jod pro Molekül Harnsäure zustrebt*, einem Zustand, der immerhin stabil genug ist, daß *O. Fürth* und seine Mitarbeiter ein jodometrisches Harnsäurebestimmungsverfahren darauf basieren konnten.

Ich habe mich daher, auf Veranlassung von *O. Fürth*, durch eine Reihe von Versuchen bemüht, einen Beitrag zur Klärung dieser Frage beizubringen und vor allem festzustellen, *in welche Form die Hauptmenge des Harnsäurestickstoffs denn eigentlich übergeführt sei, nachdem der erwähnte stabile Endzustand einmal eingetreten ist.* Die Frage aber, wie und über welche Zwischenprodukte dieser Endzustand erreicht wird, wird in dieser Untersuchung völlig beiseite gelassen.

II. Vorversuche über das Ausmaß der erzielbaren Jodaufnahme der Harnsäure.

Da sich die Versuche von *Kreidl* einerseits, von *Fürth, Urbach* und *Wermer* andererseits auf sehr geringe Harnsäuremengen, meist nur Milligramme, beziehen, mußte zunächst durch Vorversuche das *Ausmaß* des beim Arbeiten mit *größeren* Harnsäuremengen tatsächlich erzielbaren *Jodverbrauchs* festgestellt werden.

a) 2 g Harnsäure wurden in 100 ccm n NaOH in der Wärme gelöst. Andererseits wurden 5,26 g Jod mit 10 g Jodkalium in 200 ccm Wasser gelöst und diese Lösung langsam und in kleinen Portionen zu der Harnsäure-

lösung hinzugefügt. Schon nach Zusatz von etwa der halben Flüssigkeitsmenge war Gelbfärbung bemerkbar. Es wurde nun kurze Zeit mäßig erwärmt, wobei die Gelbfärbung wieder verschwand. Es wurde nun auf 1 Liter aufgefüllt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tage wurde ein aliquoter Teil mit Salzsäure angesäuert und das frei gewordene Jod unter Zusatz von Stärkekleister mit n/10 Thiosulfat zurücktitriert. Nach Umrechnung ergab sich für 1 g Harnsäure 1,73 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **2,3 Atome** Jod.

b) 1 g Harnsäure in 50 ccm n NaOH in der Wärme gelöst. Andererseits wurden 2,63 g Jod in Wasser unter Zusatz von 5 g Jodkalium gelöst und die Lösung mit Natronlauge bis zur hellgelben Färbung versetzt. Beide Lösungen wurden zusammengegossen, auf ½ Liter aufgefüllt, jedoch nicht sogleich, sondern erst am nächsten Tage ein aliquoter Teil nach Ansäuern mit Salzsäure titriert. Der Jodverbrauch betrug hier: für 1 g Harnsäure 1,65 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **2,20 Atome** Jod.

c) 0,5 g Harnsäure in 50 ccm n NaOH gelöst. Andererseits 2,50 g Jod in Wasser unter Zusatz von 5 g Jodkalium gelöst, die Lösungen zusammengegossen, auf 250 ccm aufgefüllt.

Ein aliquoter Teil (50 ccm), *sogleich* angesäuert und titriert, ergab eine Jodaufnahme für 1 g Harnsäure 2,16 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **2,88 Atome** Jod.

Ein anderer Teil dagegen wurde erst nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur angesäuert und titriert. Die Jodaufnahme betrug nunmehr für 1 Molekül Harnsäure nur **2,27 Atome** Jod.

Wir vermochten sonach die sonderbare, bereits von *J. Kreidl* (l. c.) beobachtete Tatsache zu bestätigen, daß bei längerer Einwirkung der alkalischen Jodlösung auf Harnsäure der Jodverbrauch nicht, wie man erwarten sollte, zunimmt, vielmehr abnimmt. *A. Jolles* (l. c.) hat versucht, diese Erscheinung aus dem Umstande zu erklären, daß, wenn die alkalische Flüssigkeit längere Zeit stehen bleibt, es durch Wechselwirkung des harnsauren Alkalis und des Jodkaliums angeblich zu sekundärer Jodabscheidung kommt, welche bei der Titration einen effektiven Minderverbrauch von zugesetztem Jod vortäuscht.

Es verhalte sich dies wie immer — jedenfalls gelingt es also nicht, indem man die Einwirkungsdauer der alkalischen Jodlösung auf die Harnsäure in die Länge zieht, den von uns angestrebten Zustand zu erzwingen, nämlich die Aufnahme von etwa $3^1/_2$ Atomen Jod pro Molekül Harnsäure. Es gelang dies nur in der Weise, daß nach Zusatz der alkalischen Jodlösung zur alkalischen Harnsäurelösung sogleich durch Ansäuern der Jodüberschuß frei gemacht, die saure Lösung aber erst nach längerem Stehen titriert wurde, derart, daß an eine alkalische Phase der Jodeinwirkung eine saure Phase angeschlossen wurde.

d) Zunächst wie Versuch c). Bei Titration sogleich nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure betrug Jodaufnahme (aliquote Teile!): für 1 g Harnsäure 1,88 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **2,51 Atome** Jod.

Nach Stehen über Nacht: für 1 g Harnsäure 2,71 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **3,62 Atome** Jod.

Nach einem weiteren Tage bei Zimmertemperatur: für 1 g Harnsäure 2,69 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **3,59 Atome** Jod.

e) Ein weiterer analoger Versuch ergab: bei Titration sogleich nach dem Ansäuern eine Jodaufnahme (aliquote Teile) für 1 g Harnsäure 2,38 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **3,18 Atome** Jod.

Nach 1½stündigem Stehen der angesäuerten Flüssigkeit für 1 g Harnsäure 2,61 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **3,48 Atome** Jod.

Nach zweitägigem Stehen für 1 g Harnsäure 2,50 g Jod, das sind für 1 Mol. Harnsäure **3,33 Atome** Jod.

Es bestätigt sich also die Tatsache, daß die Reaktion unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen einem *Grenzzustande zustrebt, der durch eine maximale Jodaufnahme von etwa 3½ Atomen Jod pro Molekül Harnsäure charakterisiert erscheint.*

Unsere weiteren Versuche galten nun der Frage, ob sich die Natur dieses Grenzzustandes irgendwie charakterisieren lasse.

III.

Ich ging nun weiter derart vor, daß ich in einem ¼ Liter fassenden Meßkolben 1,0 g Harnsäure in 100 ccm n Natronlauge in der Wärme löste und mit einer Lösung von 4,0 g Jod und 8 g Jodkalium in wenig Wasser mischte. Es wurde nunmehr mit 10proz. Schwefelsäure angesäuert und zur Marke aufgefüllt. 50 ccm dieser Lösung wurden nach sechsstündigem Stehen mit n/10 Thiosulfatlösung unter Verwendung von Stärkekleister titriert, wobei ein Jodverbrauch von 2,35 g Jod für 1 g Harnsäure, bzw. von **3,14 Atomen Jod für ein Molekül Harnsäure** resultierte. Die restliche (0,8 g Harnsäure in 200 ccm Flüssigkeit enthaltende) Lösung wurde nunmehr mit der sich aus der Titration ergebenden, zur Jodbindung eben erforderlichen Menge n/10 Thiosulfatlösung versetzt, durch Zusatz von n NaOH gegen Lackmus neutralisiert. Das Gemenge wurde in einen ½-Liter-Meßkolben übergespült und zur Marke aufgefüllt (Lösung „*X*", 0,8 g Harnsäure in 500 ccm entsprechend). Mit dieser Lösung *X* wurde nun eine Reihe von Versuchen ausgeführt. Dieselbe enthielt, wie die Murexidprobe ergab, keine Spur unveränderter Harnsäure mehr.

A. Gehalt von X an lockerem, als Ammoniak abspaltbarem Stickstoff.

Um festzustellen, ein wie großer Anteil des ursprünglich in der Harnsäure festgebundenen Stickstoffs nunmehr im Reaktionsgemenge als lockerer, als Ammoniak leicht abspaltbarer Stickstoff vorhanden sei, wurden 50 ccm von *X* (0,080 g Harnsäure und demnach 0,027 g Harnsäurestickstoff entsprechend) in einen Kjeldahlkolben übertragen, mit Essigsäure schwach angesäuert und nunmehr nach Zusatz eines Überschusses von *Magnesia* im Kjeldahlapparat unter Vorlage von n/10 H_2SO_4 destilliert. Es resultierte nur 0,0011 g Stickstoff, entsprechend **4,1 Proz. des Harnsäurestickstoffs.**

Es wurden nun 50 ccm Kjeldahllauge zugefügt, die Vorlage gewechselt und weiter destilliert. Es gingen jetzt reichliche Mengen von NH_3 über. Der Versuch wurde nach 1½ Stunden abgebrochen, nachdem bereits etwa ein Drittel des ursprünglichen Harnsäurestickstoffs übergegangen war, ohne daß die NH_3-Abspaltung zu Ende gelangt wäre.

Das Reaktionsgemenge enthält also nur sehr geringe Mengen lockeren *Ammoniak*stickstoffs, dagegen in reichlichen Mengen eine Substanz, die, etwa nach der Art des Harnstoffs, von starker, kochender Natronlauge langsam unter NH_3-Bildung zersetzt wird.

B. Harnstoffbestimmung nach Mörner-Sjöquist.

Zwei Parallelproben zu 50 ccm von *X* (entsprechend je 0,080 g Harnsäure, entsprechend 0,0266 g Harnsäurestickstoff) wurden in weithalsigen Kolben am Wasserbad auf die Hälfte eingeengt, mit 4 g feingepulvertem Ätzbaryt und mit 100 ccm einer Mischung von 65 ccm Alkohol und 35 ccm Äther versetzt. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde durch ein trockenes Faltenfilter filtriert, mit Alkohol-Äthergemenge (65 : 35) nachgewaschen, der Alkohol-Äther abgedampft und kjeldahlisiert. Es resultierten 0,0235 bzw. 0,0214 g, Mittel 0,0224 g Stickstoff, was **84,2 Proz. des ursprünglichen Harnsäurestickstoffs** entspricht.

Die Tatsache, daß die Hauptmenge des Harnsäurestickstoffs bei der maximalen Jodoxydation als Harnstoff zutage tritt, ist (s. unten) später mit Hilfe des *Ureaseverfahrens* sichergestellt worden. Doch dürfte schon darum der Mörner-Sjöquist-Stickstoff nicht ohne weiteres als Harnstoffstickstoff bezeichnet werden, weil, wie *Poduschka*[1]) gezeigt hat, der Stickstoff aus reinen *Allantoin*lösungen quantitativ in diese Fraktion übergeht, das Reaktionsgemenge aber, wie von vornherein wahrscheinlich war und wie der nächste Versuch auch wirklich zeigt, nicht zu vernachlässigende Mengen von *Allantoin* enthält.

C. Allantoinbestimmung nach Wiechowski.

57 ccm der Lösung *X* wurden mit 5 ccm 10proz. Schwefelsäure, 5 ccm Essigsäure und mit einem Überschuß von *Phosphorwolframsäure* versetzt, wobei ein ziemlich reichlicher, amorpher, sich gut absetzender Niederschlag ausfiel. Nach mehrstündigem Stehen wurde ein aliquoter Teil abfiltriert, mit *Bleioxyd* unter Umrühren bis zum Eintritt alkalischer Reaktion versetzt und sodann mit *Bleiessig* gefällt. Nach kurzdauerndem Absetzen wurde ein aliquoter Teil durch ein mit Kieselgur beschicktes trockenes Faltenfilter filtriert, dann mit H_2S entbleit, der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom vertrieben, die Flüssigkeit mit *Magnesia* gegen Lackmus neutralisiert, scharf abgenutscht, mit Wasser nachgewaschen und das Filtrat endlich mit dem „*Allantoinreagens*" (einer Auflösung von 5 g Mercuriacetat und 200 g Natriumacetat in 1 Liter Wasser) versetzt. Nach mehrstündigem Stehen wurde der sehr gut filtrierbare Niederschlag abfiltriert, Hg-frei gewaschen und kjeldahlisiert. Derselbe enthielt, wie die Umrechnung ergab, **13,5 Proz. des Stickstoffs der Ausgangsharnsäure.**

---

[1]) *Poduschka*, Arch. f. exper. Pathol. 44.

Falls tatsächlich das gesamte Allantoin quantitativ in die Mörner-Sjöquistfraktion (s. oben) übergeht, würde sich die gefundene *Harnstoff*-ausbeute auf 84,2 — 13,5 = **70,7 Proz.** reduzieren.

D. Prüfung auf die Anwesenheit von Alloxan.

Dieselbe wurde deswegen vorgenommen, weil, falls die Harnsäureoxydation durch Jod nach dem *Vitalischen Schema* (s. oben) vor sich gehen sollte, die Hälfte des gesamten Stickstoffs wenigstens intermediär als Alloxan

```
        NH—CO
       /     |
    CO       CO
       \     |
        NH—CO
```

auftreten müßte. Nun ist das Alloxan leicht selbst in großen Verdünnungen nachweisbar, da es mit Eisenoxydulsalzen eine tief indigblaue Färbung gibt. Vorproben ergaben, daß diese Reaktion am besten so angestellt wird, daß man die zu prüfende, annähernd neutrale Lösung mit einem Tropfen 10proz. Natriumcarbonatlösung, sodann tropfenweise mit verdünnter Ferrosulfatlösung versetzt und die störende Niederschlagsbildung durch Seignettesalzzusatz beseitigt. Übrigens stört auch die Gegenwart von viel Alkali (5 Proz. NaOH) die Reaktion nicht.

Die Probe fiel nicht nur in dem vorliegenden Reaktionsgemische *X*, sondern auch in den Reaktionsgemischen früherer Proben (Abschnitt 2, Proben a, b, c) stets völlig negativ aus. Wurde die Lösung *X* dagegen mit wenigen Tropfen einer stark verdünnten Alloxanlösung versetzt, so wurde alsbald positive Reaktion erhalten, derart, daß der negative Ausfall der Reaktion nicht etwa durch die Gegenwart störender Substanzen, sondern tatsächlich durch die *Abwesenheit von Alloxan* bedingt ist. *Da also das Alloxan stets abwesend war, selbst wenn der Jodverbrauch pro Molekül Harnsäure nur wenig über 2 Atome Jod betragen hatte, muß die Vitalische Reaktionsgleichung zum mindesten für die von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen abgelehnt werden.*

IV.

Um nun über die bei der Jodoxydation der Harnsäure auftretenden hauptsächlichen Endprodukte weiteren Aufschluß zu erlangen, wurden nunmehr 2 g Harnsäure in ganz analoger Weise wie in Versuch III der Jodoxydation unterworfen:

Die Lösung von 2,0 g Harnsäure in 200 ccm n NaOH wurde mit einer Auflösung von 8 g Jod und 16 g Jodkalium in einem ½-Liter-Meßkolben zusammengegossen, sogleich mit 10proz. Schwefelsäure angesäuert, auf ½ Liter aufgefüllt und mehrere Stunden stehengelassen.

Die Titration von 50 ccm der Flüssigkeit mit n/10 Thiosulfat ergab nunmehr einen Jodverbrauch von **3,72 Atomen Jod pro Molekül Harnsäure**, also noch etwas mehr als früher. Die restierende Hauptmenge der Reaktionsflüssigkeit (450 ccm entsprechen 1,8 g Harnsäure) wurde weiterhin mit der errechneten (zur Beseitigung des freien Jods erforderlichen) Menge n/10 Thiosulfatlösung versetzt, mit n NaOH neutralisiert, in einen 1-Liter-Meßkolben übergespült und zur Marke aufgefüllt. Es resultierte so eine Lösung „*Y*" (1,8 g Harnsäure, entsprechend 1000 ccm Flüssigkeit).

A. Gehalt von Y an lockerem, als Ammoniak abspaltbarem Stickstoff.

Versuch mit 100 ccm der Lösung *Y* (entsprechend 0,18 g Harnsäure), analog wie Versuch III A durchgeführt. Die Magnesiadestillation ergab, in völliger Übereinstimmung mit diesem Versuche, wiederum nur **3,7 Proz. des Harnsäurestickstoffs** als Ammoniakstickstoff.

B. Gehalt an durch protrahierte Alkalihydrolyse als Ammoniak abspaltbarem Stickstoff.

Der vorige Versuch wurde nunmehr derart fortgesetzt, daß der durch Magnesiadestillation von Ammoniak befreiten Lösung *Y* im Kolben des Kjeldahlapparats 50 ccm Kjeldahllauge hinzugefügt wurden. Beim Destillieren gingen nunmehr reichliche Mengen von Ammoniak über und es dauerte 10 Stunden, bis die Destillation zum Abschluß gekommen war. Schließlich waren noch **83,0 Proz. des ursprünglichen Harnsäurestickstoffs** als Ammoniakstickstoff übergegangen (außer den 3,7 Proz. bei der Magnesiadestillation), von denen jedenfalls weitaus die Hauptmenge auf Rechnung der *Harnstoffzersetzung*, ein Teil aber wohl auch auf Rechnung des gegen starke Alkalienwirkung nicht widerstandsfähigen *Allantoins* kommt.

C. Harnstoffgehalt, nach der Ureasemethode bestimmt.

In abgemessenen Teilen von *Y* wurde nunmehr der Harnstoffgehalt nach der Ureasemethode (Methylorangetitration) ermittelt. Die Urease gelangte in Form von Pastillen (von der amerikanischen Firma Squibb) zur Anwendung, deren Wirksamkeit an einer Lösung von reinem Harnstoff erprobt worden war. (Nach $\frac{3}{4}$ Stunden bei 45 bis 50° gefunden statt 0,100 g Harnstoff 0,097 bzw. 0,099 g). Auf 20 ccm der Lösung *Y* gelangte je eine Ureasepastille zur Anwendung. Nach $\frac{3}{4}$ Stunden bei 45 bis 50° wurde titriert, dann eine weitere Pastille noch $\frac{1}{2}$ Stunde einwirken gelassen.

Es resultierte eine Ausbeute an Harnstoffstickstoff entsprechend **69,2 Proz. des Harnsäurestickstoffs.**

D. Allantoinbestimmung nach Wiechowski.

Mit zwei Portionen zu 100 ccm (entsprechend je 0,18 g Harnsäure) wurde die Allantoinbestimmung nach *Wiechowski* ganz analog Versuch III C durchgeführt. Es resultierten in völliger Übereinstimmung

14,2 bzw. 14,1 Proz. Allantoinstickstoff vom Harnsäurestickstoff gegenüber 13,5 Proz. im Versuch III C.

Die Menge des in Versuch IV B durch protrahierte Alkalienwirkung in der Hitze in Form von Ammoniak schließlich gewonnenen Stickstoffs (83 Proz.) entspricht genau der Summe von Harnstoffstickstoff + Allantoinstickstoff : 69 + 14 = 83 Proz. Dabei ist zu beachten, daß Allantoin bei Spaltung mit Natronlauge zunächst Harnstoff liefern[1]), dieser aber weiter unter Ammoniakabspaltung zerfallen kann.

E. *Oxalsäureabspaltung.*

Da unter den Produkten der Harnsäureoxydation verschiedener Art die Oxalsäure eine große Rolle spielt, wurde zunächst eine Probe von *Y direkt* auf Oxalsäure geprüft. Die Reaktion fiel aber negativ aus. Eine andere Probe von *Y* (20 ccm), mit dem gleichen Volumen konzentrierter *Salzsäure* auf dem Wasserbade auf etwa 5 ccm eingeengt, mit Natronlauge neutralisiert, zeigte reichliche *Neubildung von Oxalsäure,* noch reichlichere jedoch eine weitere Probe, die mit dem gleichen Volumen 10proz. *Natronlauge* auf dem Wasserbade eingeengt worden war.

Es wurden nunmehr 100 ccm der Lösung *Y* (entsprechend 0,18 g Harnsäure) mit 50 ccm 30proz. Natronlauge in einer Porzellanschale auf ein kleines Volumen eingeengt. Es wurde dann mit konzentrierter Salzsäure gegen Lackmus neutralisiert, abgeschiedene Kieselsäure durch Filtration beseitigt und schließlich die Oxalsäure in üblicher Weise durch Fällung mit Calciumchlorid + Ammoniak und Titration mit Permanganat ermittelt. Es kamen so **38,7 Proz. des Harnsäuregewichts** (oder *rund ein Drittel des Harnsäurekohlenstoffs*) *in Form von Oxalsäure (bzw. Oxalsäure-C) nach vollzogener hydrolytischer Spaltung zum Vorschein.*

F. *Kohlensäurebildung beim Oxydationsvorgang.*

Nach der Reaktionsgleichung von *Bryk* müßte ein Molekül Harnsäure bei der Jodoxydation bei alkalischer Reaktion je ein Molekül Allantoin und ein Molekül Kohlensäure liefern; es müßte sonach in der alkalischen Reaktionsflüssigkeit ein Fünftel des Harnsäurekohlenstoffs als Kohlensäure zum Vorschein kommen und beim Ansäuern des Reaktionsgemisches in Gasform entwickelt werden. Da nun aber beim Ansäuern der alkalischen Reaktionsflüssigkeit nichts von einer auffälligen Gasentwicklung zu bemerken war, erschien ein solcher Sachverhalt von vornherein unwahrscheinlich. Um darüber aber volle Klarheit zu erlangen, wurde folgender Versuch angestellt:

1 g Harnsäure wurde unter Erwärmen in 100 ccm n NaOH gelöst, die Lösung in einen mit einem seitlichen Tubus versehenen Kolben gebracht und dann mit einer Lösung von 4 g Jod und 8 g Jodkalium in wenig Wasser versetzt. Der Kolben war oben mit einem Stopfen verschlossen, dessen

[1]) Vgl. Biochem. Handlex. 4, 1155.

Bohrung einen 60 ccm 10proz. Schwefelsäure enthaltenden Tropftrichter trug. Die lange Abflußröhre des Tropftrichters tauchte in das Jodreaktionsgemisch. Diese einfache Anordnung gestattete mit Hilfe einer Wasserstrahlluftpumpe und unter Einschaltung einer Vorlage mit titrierter n/5 Barytlösung, nachdem der Hahn des Tropftrichters geöffnet und die Schwefelsäure in das Reaktionsgemisch eingeflossen war, einen langsamen Strom von Kohlensäure befreiter Luft durch den Apparat zu leiten und die ganze aus dem Reaktionsgemenge in Freiheit gesetzte Kohlensäure in die Barytvorlage überzuführen. Dabei mußte durch einen Blindversuch ohne Harnsäure jene Kohlensäuremenge als Korrektur ermittelt werden, welche in der benutzten Natronlauge von vornherein vorhanden war. Es ergab sich so:

	Versuch a ccm n/10 CO_2	Versuch b ccm n/10 CO_2
Im Hauptversuche	38,1	40,0
Im Blindversuche	15,5	17,2
Auf Rechnung der Harnsäureoxydation . . .	22,6	22,8

Es waren sonach aus 1 g Harnsäure 22,8 bzw. 22,6 im Mittel 22,7 ccm n/10 CO_2 oder 22,7 × 0,0022 = 0,050 g CO_2 gewonnen worden, das sind 5 Proz. der Harnsäure. Da 1 g Harnsäure 0,357 g Kohlenstoff enthält, 0,050 g CO_2 aber 0,014 g Kohlenstoff entsprechen, bedeutet dies, daß vom Kohlenstoff der Harnsäure nicht, wie es die *Bryk*sche Formulierung erfordert, ein Fünftel, sondern nur ein geringer Bruchteil (3,9 Proz.) nachgewiesen werden konnte. *Bei der Jodoxydation der Harnsäure treten also bei den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen nur ganz unbedeutende Kohlensäuremengen auf.*

V.

Versuchen wir nunmehr, indem wir die gewonnenen Resultate überblicken, eine Vorstellung darüber zu gewinnen, wie sich der ursprüngliche Harnsäurestickstoff unter die nachweisbaren Endprodukte der Reaktion verteilt, so ergibt sich folgendes (Harnsäurestickstoff gleich 100 Proz.):

	Versuch I Proz.	Versuch II Proz.	Mittel Proz.
1. Ammoniak-N	4,1	3,7	3,9
2. Harnstoff-N (Mörner-Sjöquist-N minus Allantoin-N)*	70,7*	69,2	70,0
3. Allantoin-N	13,5	14,2	13,9
Unbestimmter Rest	—	—	12,2
			100,0

Der unbestimmte Rest dürfte hauptsächlich auf irgendwelche Substanzen entfallen, die bei der Hydrolyse unter *Oxalsäurebildung* zerfallen.

Als stickstoffhaltiges Hauptprodukt tritt also der *Harnstoff* zutage. Daneben treten nicht unbedeutende *Allantoin*mengen auf.

Um schließlich festzustellen, *ob das Allantoin durch Jodoxydation nicht weiter angreifbar sei*, wurde ein Allantoinpräparat durch Oxydation von 50 g reiner Harnsäure nach dem Verfahren von *Sundwick*[1]) durch Permanganatoxydation als schneeweißes, schön kristallisiertes Präparat gewonnen. Eine Kjeldahlbestimmung ergab 35,28 Proz. Stickstoff (statt des theoretischen Wertes von 35,49 Proz.). 1 g davon wurde nun genau so, wie dies früher bei der Harnsäureoxydation geschehen war, in 100 ccm n NaOH gelöst, eine Lösung von 4,0 g Jod und 8 g Jodkalium in wenig Wasser hinzugefügt, sogleich mit 60 ccm 10proz. Schwefelsäure angesäuert, auf $\frac{1}{4}$ Liter aufgefüllt und nach 2 Stunden ein aliquoter Teil zurücktitriert. Es ergab sich nur ein *geringfügiger Jodverbrauch, weniger als $^1/_4$ Atom Jod pro Molekül Allantoin entsprechend.*

Zusammenfassung.

1. Bei der Harnsäureoxydation durch Jod unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen strebt die Reaktion einem stabilen Endzustand zu, wobei auf je ein Molekül Harnsäure maximal etwa $3\frac{1}{2}$ Atome Jod in Aktion treten.

2. Ist der Endzustand erreicht, so ist die Hauptmenge des ursprünglich in der Harnsäure enthaltenen Stickstoffs (etwa 70 Proz.) in die Form von *Harnstoff* übergegangen.

3. Daneben tritt ein Bruchteil (etwa ein Siebentel) des Stickstoffs als *Allantoin* zutage, welches, vermutlich einer Nebenreaktion entstammend, unter den gewählten Versuchsbedingungen von Jod kaum direkt angreifbar erscheint.

4. *Alloxan* konnte in der Reaktionsflüssigkeit in keiner Phase, *Ammoniak* und *Kohlensäure* nur in unbedeutenden Mengen nachgewiesen werden.

5. *Oxalsäure* in fertigem Zustande tritt in der Reaktionslösung nicht auf. Dagegen sind reichliche Mengen einer Substanz (oder mehrerer Substanzen) vorhanden, welche bei hydrolytischer Spaltung Oxalsäure liefern.

6. Die Harnsäureoxydation durch Jod erscheint als ein Vorgang, bei dem die auf Abspaltung des Stickstoffs in Form von Harnstoff hinzielende Hauptreaktion durch Nebenreaktionen derart kompliziert erscheint, daß eine präzise Formulierung auch nur der Endphase des Vorgangs derzeit als nicht möglich erscheint.

---

[1]) *E. E. Sundwick*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 343, 1904.

Proteintherapie und Phlorrhizinglykosurie.

Von

Anton Fischer und Heinrich Weiss.

(Aus der I. medizinischen Abteilung der Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ und der chemischen Abteilung des physiologischen Universitätsinstituts in Wien.)

(Eingegangen am 30. März 1925.)

Seit Bekanntwerden der Insulinwirkung auf den normalen und pathologisch gestörten Kohlenhydratstoffwechsel steht die Frage, ob es sich um eine *spezifische* Beeinflussung bzw. um eine physiologische Organfunktion handelt oder eine pharmakodynamische Wirkung, die auch von anderen Agenzien ausgelöst werden kann, im Mittelpunkt des Interesses. Während von einer Anzahl von Autoren aus tierischen und pflanzlichen Geweben Stoffe dargestellt worden sind, die imstande waren, den Blutzuckerspiegel in charakteristischer Weise zu verändern, hatte *G. Singer* (1), hauptsächlich auf Grund klinischer Erfahrungen, die Möglichkeit einer *unspezifischen* Beeinflussung des Stoffwechsels mittels Proteinkörpertherapie beim menschlichen Diabetes nahegelegt.

Experimentelle Untersuchungen über Proteintherapie und Kohlenhydratstoffwechsel wurden nach der *Singer*schen Mitteilung zuerst von *Bertram* und *Bornstein* (2) veröffentlicht. Sie fanden einen Absturz der Adrenalinhyperglykämie durch subkutane Injektion von Caseosan; in einer weiteren Arbeit *Bertrams* (3) konnte über das Verschwinden der Hyperglykämie und der Glykosurie bei pankreasexstirpierten Hunden durch wiederholte Darreichung dieses Mittels berichtet werden.

Ausgehend von der Anschauung, daß das Wesen der Phlorrhizinglykosurie neben einer abnormen Zuckerdurchlässigkeit der Niere auch in einer Hemmung der Verwertung der Kohlenhydrate durch alle Gewebselemente besteht, haben wir Versuche ausgeführt, um aus der quantitativen Veränderung des Stoffwechsels unter Phlorrhizinwirkung stehender Tiere den Mechanismus der unspezifischen Beeinflussung kennenzulernen.

I. Phlorrhizin-Caseosanversuche.

Die Methodik unserer Versuche beruht auf den grundlegenden Untersuchungen von *Graham Lusk* (4). Die Hunde bekamen nach eintägigem Hungern eine Suspension von 1 g Phlorrhizin (*Merck*) in 7 ccm sterilem Olivenöl subkutan injiziert; die Injektion wurde in 24stündigen Intervallen wiederholt und in der ausgeschiedenen Harnmenge der Stickstoff nach *Kjehldal* und der Zucker nach *Bertrand* bestimmt. Das Verhältnis D : N stellte sich am zweiten bis dritten Tage meist auf 3,0 bis 3,6 ein. Die Versuche wurden bis zum siebenten bis neunten Tage ausgedehnt; nach Aussetzen trat bei den Hunden rasche Erholung ein. Der durchschnittliche Gewichtsverlust betrug 2 kg.

Einer Anzahl von Hunden haben wir nach erfolgter Einstellung auf eine einigermaßen konstante Relation D : N 1 bis 2 ccm Caseosan (*Heyden*) intramuskulär injiziert. Die Tabellen I bis V geben die Resultate wieder.

Versuch 1 (Hund, 12½ kg).

Hungertag	Phlorrhizin g	Dextrose g	Stickstoff g	D : N	Caseosan ccm
1	1	—	—	—	—
2	1	22,33	4,93	4,53	—
3	1	27,33	7,98	3,42	—
4	1	17,1	6,37	2,68	—
5	1	14,32	4,77	3,04	1
6	1	30,87	11,32	2,73	1
7	—	7,6	5,7	1,32	—
Versuch 2 (Hund, 12½ kg).					
1	1	—	—	—	—
2	1		kein Harn		
3	1	41,6	12,85	3,3	1
4	1	22,8	7,51	3,0	1
5	1	18,0	7,46	2,4	1
6	1	18,6	7,1	2,6	1
7	—	17,2	5,7	3,0	—
Versuch 3 (Hund, 14 kg).					
1	1	—	—	—	—
2	1	9,0	6,75	1,3	—
3	1	51,5	11,5	4,4	—
4	1	27,1	6,9	3,9	—
5	1	27,9	8,2	3,4	1
6	1	20,3	6,9	2,9	1
7	1	26,4	7,8	3,4	1
8	1	22,6	7,3	3,1	2
9	—	18,1	6,8	2,7	—
Versuch 4 (Hund, 7,5 kg).					
1	1	—	—	—	—
2	1	20,0	4,21	4,7	—
3	1	17,3	5,8	3,0	—
4	1	18,2	5,87	3,1	—
5	1	14,6	4,4	3,3	2
6	1	12,8	4,6	2,8	2
7	—	7,7	2,7	2,8	—

Versuch 5 (Hund, 12 kg).

Hungertag	Phlorrhizin g	Dextrose g	Stickstoff g	D : N	Caseosan ccm
1	1	—	—	—	—
2	1	18,85	4,91	3,84	—
3	1	20,7	6,34	3,26	2
4	1	30,6	9,4	3,38	2
5	—	15,9	4,47	3,5	—

Bei dem ersten Versuch finden wir am Tage nach der ersten Caseosaninjektion eine Abnahme des Verhältnisses D : N von 3,04 auf 2,73, am zweiten Tage ist der Quotient auf 1,32 gesunken. Bei den Versuchen 2 bis 4 tritt nach Caseosan eine leichte Senkung des Quotienten ein, der allerdings nach 2 bis 3 Tagen wieder die alte Höhe erreicht. Beim Versuch 5 konnten wir eine Veränderung nicht feststellen.

Anschließend an diese Versuche untersuchten wir das Verhalten der während der Phlorrhizinwirkung subkutan einverleibten Dextrose bei Hunden, die mit Caseosan behandelt worden sind. Es ist seit der Untersuchung von *Lusk* (l. c.) bekannt, daß subkutan beigebrachte Dextrosemengen bis 10 g von Phlorrhizinhund nicht verwertet werden können und die injizierte Menge im Harn quantitativ als Extra-D erscheint. Die Berechnung des letzteren erfolgt in der Weise, daß der ausgeschiedene Stickstoff mit dem Faktor 3,6 multipliziert und das Produkt von der Menge der ausgeschiedenen Dextrose subtrahiert wird.

Versuch 6 (Hund, 14 kg).

Hungertage	Phlorrhizin g	Dextrose g	Stickstoff g	D:N	Extra-D	Anmerkung
1	1	—	—	—	—	—
2	1	6,08	11,28	0,54	—	5 g Dextrose in 20 ccm Wasser
3	1	58,5	11,2	5,2	18,2	1 ccm Caseosan
4	1	21,8	4,28	5,1	6,4	1 ccm Caseosan, 5 g Dextrose in 20 ccm Wasser
5	—	39,6	11,09	3,5	0	—
Versuch 7 (Hund, 12 kg).						
1	1	—	—	—	—	—
2	1	13,25	7,72	1,7	—	—
3	1	27,8	10,2	2,72	—	—
4	1	23,2	9,1	2,55	—	10 g Dextrose in 50 ccm Wasser
5	1	23,56	6,94	3,4	0	—
6	1	24,93	8,8	2,8	0	1 ccm Caseosan, 10 g Dextrose in 50 ccm Wasser
7	1	29,7	8,08	3,67	0	1 ccm Caseosan
8	—	2,64	3,65	0,72	0	—

Im Versuch 6 hat der Hund außer der injizierten Dextrose noch einen Überschuß an Extra-D ausgeschieden, der offenbar aus Glykogenreserven herstammt. Nach Caseosaninjektion wurde die parenteral eingeführte

Dextrose verwertet, ein Extra-D wurde nicht ausgeschieden. Im Versuch 7 wurde ein Extra-D auch vor der Caseosaninjektion nicht ausgeschieden, jedoch sank das Verhältnis D : N am zweiten Tage nach der ersten Caseosanapplikation von 3,6 auf 0,72.

II. Phlorrhizinserumversuche.

Da Caseosan ein tief abgebautes Proteinpräparat darstellt, das nicht imstande ist, die die körperfremden Proteine biologisch kennzeichnende typische Anaphylaxie zu erzeugen, haben wir in den Versuchen 8 bis 9 an Stelle des Caseosans steriles Pferdeserum verwendet.

Versuch 8 (Hund, 11 kg).

Hungertag	Phlorrhizin g	Dextrose g	Stickstoff g	D:N	Pferdeserum ccm
1	1	—	—	—	—
2	1	19,9	7,81	2,52	—
3	1	27,16	10,1	2,7	1
4	1	21,75	8,82	2,47	2
5	1	26,48	10,92	2,43	5
6	—	20,4	9,07	2,25	—
		Versuch 9 (Hund, 11 kg).			
1	1	—	—	—	—
2	1	21,42	2,38	9	5
3	1	15,0	4,1	3,7	5
4	—	11,5	4,62	2,5	Anaphylaxie

In Versuch 8 hat sich das Verhältnis D : N nur wenig geändert, es sank allmählich von 2,7 auf 2,25. Der Versuch 9 wurde am selben Hunde 1 Woche nach Ende des ersten Versuchs angesetzt, am vierten Tage wurden typische anaphylaktische Erscheinungen beobachtet.

Besprechung der Versuchsresultate.

1. Aus den mitgeteilten Versuchen ist ersichtlich, daß nach geringen Dosen von Caseosan in zwei Fällen das Verhältnis D : N eine Abnahme von 60 bis 80 Proz. zeigt. In drei weiteren Fällen ist das Sinken zwar nicht so groß, jedoch immerhin noch angedeutet. In einem Falle war das Caseosan ohne Wirkung.

2. Aus Versuch Nr. 6 geht hervor, daß in einem Falle die Verwertbarkeit von parenteral einverleibter Dextrose durch Caseosaneinwirkung anscheinend ermöglicht worden ist.

3. Auch nach Seruminjektionen konnten wir ein geringes Absinken des Quotienten D : N beobachten.

4. *Th. Nash* (5) hat unter Wirkung von *Insulin* auf phlorrhizinvergiftete Hunde eine Verminderung der N-Ausscheidung gesehen. Während er in einem mitgeteilten Versuch eine Verminderung der N-Ausscheidung um 20 Proz. bei Insulinwirkung feststellt, finden wir in *manchen unserer Versuche* ein Absinken der Stickstoffausscheidung

bis 50 Proz., bei manchen Versuchen ist die Abnahme allerdings nur angedeutet und vorübergehend. Die Tatsachen scheinen dafür zu sprechen, daß bei caseosanbehandelten Hunden die Zuckerbildung aus Eiweiß vielleicht verringert ist, daneben könnte eine vermehrte Verbrennung von Zucker in den Fällen mit erniedrigtem D : N eine Rolle spielen.

Während die Veränderungen der Zucker- und Stickstoffausscheidung bereits *in wenigen Stunden* nach der *Insulinapplikation* ihr Maximum erreichen, finden wir den Höhepunkt der *Proteinwirkung* meistens am zweiten Tage nach der Injektion. Dieser Befund scheint für die Annahme zu sprechen, daß die Stoffwechselbeeinflussung durch Proteinkörpertherapie auf einer allmählichen „Umstimmung" der Gewebe beruht und von der *spezifischen* Insulinwirkung streng unterschieden werden muß.

Zusammenfassung.

Auf Grund unserer Versuche an phorrhizinvergifteten Hunden kommen wir im Zusammenhang mit den vorliegenden Literaturangaben zu der Schlußfolgerung, daß die parenterale Einverleibung von Proteinkörpern den Kohlenhydratstoffwechsel der Tiere in der Mehrzahl der Fälle anscheinend im Sinne einer besseren Verwertung der Kohlenhydrate zu beeinflussen vermag; jedoch sind in der Intensität der Beeinflussung große individuelle Verschiedenheiten festzustellen, deren Ursache nicht weiter klargelegt werden konnte.

Literatur.

1) *G. Singer*, Wien. klin. Wochenschr. 1914, Nr. 7 und 25. — 2) *Bertram* und *Bornstein*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**. — 3) *Bertram*, ebendaselbst **43**. — 4) *Lusk*, Ergebn. d. Phys. 1912. — 5) *Th. Nash*, Journ. of biol. Chem. **58**.

Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung.

IV. Mitteilung:

Untersuchungen über die Kinetik der peptischen Spaltung von Serumalbumin.

Von

P. Rona und H. Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 31. März 1925.)

Mit 17 Abbildungen im Text.

I.

Die in den vorangehenden Mitteilungen[1]) niedergelegten Beobachtungen ermöglichen es, die Kinetik der peptischen Eiweißspaltung einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. Die angewandte Methode wich nur in einzelnen Punkten von der dort beschriebenen ab. Die Spaltung erstreckte sich meist auf 150 bis 180 Minuten, die Abnahme erfolgte gewöhnlich nach 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten; angesetzt wurden für jede Reihe 46 ccm. Als Substrat diente mehrere Wochen dialysiertes Serumalbumin, das weder NH_3- noch SO_4-Reaktion mehr gab. Der Stickstoffgehalt dieser Albuminlösung betrug nach *Kjeldahl* in 1 ccm 1,2 mg; der Eiweißgehalt war also etwa 7,5 mg in 1 ccm. Benutzt wurde das Pepsin „D. A. B. 5", das genau so gut wie das früher angewandte Pepsin „*Finzelberg*" brauchbar war, nur in etwas höherer Konzentration als dieses Präparat verwendet wurde[2]). Die gewöhnliche Verdünnung war 1 : 25000, davon wurden 4 ccm zu 36 ccm gegeben, so daß die endgültige Verdünnung etwa 1 : 250000 betrug. Die Albuminlösung wurde in einer Verdünnung 1 : 2,5 Wasser zum Versuch verwandt.

Das Schema einer Versuchsanordnung mit 40 ccm Gesamtflüssigkeit wäre etwa so: 20 ccm der Albuminlösung, 10 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. Hiervon werden 10 ccm entnommen, je 4,5 ccm in zwei Gläschen als 100 proz. Ausgangslösung eingefüllt, der Rest verworfen.

---

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **140**, 461, 478; **150**, 444; **155**, 34, 1924.

[2]) Ein Pepsin-*Merck*, das mit Sulfosalicylsäure eine rosa Farbenreaktion gab, erwies sich hierdurch als ungeeignet.

Zu den 36 ccm restierender Lösung kommen 4 ccm Fermentlösung; entnommen werden für jede Probe 5 ccm, bei sieben Gliedern der Reihe also 35 ccm. Die restlichen 5 ccm dienen zur p_H-Bestimmung. Für jeden Versuch werden stets zwei gleiche Lösungen als Parallele angesetzt. Alle Versuche, wenn nicht anders angegeben, sind bei 40° angestellt. Als Vorlagen zur Aufnahme der Proben dienen Bechergläser mit NaOH gleicher Normalität wie die Versuchslösungen; meist n/200. Hierzu kommen als Reagens 5 ccm 25 proz. HCl und 7 ccm 20proz. Sulfosalicylsäure. Als Nephelometer benutzten wir wie stets das Nephelometer von *Schmidt* und *Haensch*.

In den folgenden Tabellen und Kurven sind die Versuche dargestellt, die nach der oben geschilderten Anordnung durchgeführt wurden. Die Ausgangsmenge des Substrats A wird gleich 100 gesetzt, x bedeutet die Spaltung in Prozenten des Ausgangsmaterials. Wie man sieht, entspricht der Verlauf der Kurven einer (äqui)-bimolekularen Reaktion; die nach der Formel $\frac{1}{t} \frac{x}{(a-x)\,a}$ berechneten Konstanten zeigen eine sehr befriedigende Übereinstimmung[1]). Das manchmal beobachtete leichte Absinken der Konstanten mit fortschreitender Reaktion muß wahrscheinlich auf eine Schädigung des Ferments zurückgeführt werden (vgl. S. 164).

Versuch 1. 10 ccm Substrat, 10 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Pepsin (1 : 30000). p_H 2,38.

Tabelle I.

Zeit in Minuten	0		30		60		90		120		150		180	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,1	25,3	24,9	29,2	29,1	32,5	32,4	38,0	37,8	43,0	42,2	36,1	34,3
	20,0	19,9	25,3	24,7	29,3	29,0	32,3	32,3	38,0	37,8	43,2	42,3	37,2	33,9
	20,0	20,0	24,9	25,1	29,5	29,2	32,2	32,4	37,9	37,9	41,9	42,3	37,2	34,1
Durchschnitt . . .	20,0		25,0		29,2		32,3		37,9		42,6		35,6	
Verglichen mit . .	Ia = 20		20		20		20		20		20		Ia = 15	
Spaltung in Proz. .	0		20		31,5		38,1		47,2		53,1		57,9	

Tabelle Ia (Abb. 1).

Spaltungszeit in Minuten	x	$a-x$	$\frac{x}{(a-x)\,a}\,\frac{1}{t} = k \cdot 10^5$
30	20,0	80,0	8,34
60	32,0	68,0	7,84
90	40,0	60,0	7,42
120	47,5	52,5	7,57
150	52,5	47,5	7,32
180	57,0	43,0	7,35
		Im Durchschnitt . .	$7{,}64_5$

[1]) Der Berechnung der Formel sind die aus den Kurven ermittelten Werte für x zugrunde gelegt.

Versuch 2. 10 ccm Substrat, 10 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Fermentlösung (1 : 29000). p_H 2,38.

Tabelle II.

Zeit in Minuten	0		30		60		90		120		150		180	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	24,1	24,0	28,6	28,4	32,1	31,5	36,4	36,4	41,6	39,9	32,2	32,2
	20,0	19,9	23,9	24,2	28,4	28,6	32,0	31,2	36,1	36,1	41,8	41,2	32,4	32,1
	20,0	20,1	23,9	24,2	28,7	28,6	31,9	31,2	36,3	36,3	41,8	41,1	32,5	32,2
Durchschnitt . . .	20,0		24,1		28,5		31,6		36,3		41,2		32,3	
Verglichen mit . .	I = 20		20		20		20		20		20		15	
Spaltung in Proz. .	0		16,9		29,8		36,7		44,9		51,5		53,6	

Tabelle IIa (Abb. 2).

Spaltungszeit in Minuten	x	$a-x$	$\frac{x}{(a-x)\,a}\,\frac{1}{t} = k \cdot 10^5$
30	17,0	83,0	6,84
60	29,0	71,0	6,81
90	37,5	62,5	6,70
120	45,0	55,0	6,82
150	51,0	49,0	6,94
180	55,5	44,5	6,92
		Im Durchschnitt . .	$6{,}83_8$

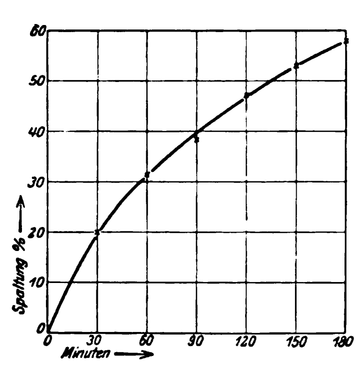


Abb. 1.

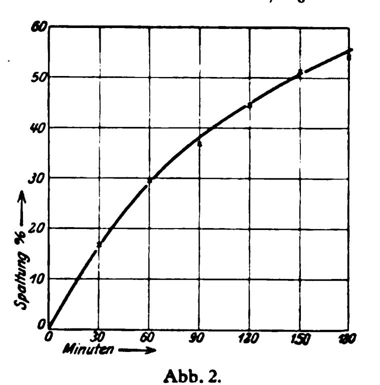


Abb. 2.

Versuch 3. Anordnung wie in Versuch 2. p_H 2,29.

Tabelle III.

Zeit i. Minuten	0		15		30		45		60		90		120		150	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	23,1	23,2	26,6	26,3	30,3	29,7	32,7	31,6	36,6	38,1	34,5	—	40,1	–
	20,0	20,0	23,4	23,2	26,7	26,3	30,0	29,9	32,1	31,4	36,8	37,9	34,3	—	39,9	–
	20,0	20,0	23,2	23,4	26,5	26,4	30,2	29,7	32,3	31,5	36,6	38,0	34,2	—	40,2	–
Durchschnitt .	20		23,3		26,4		30,0		32,3		37,3		34,3		40,1	
Verglichen mit	Ia = 20		20		20		20		20		20		Ia = 15		15	
Spaltg. i. Proz.	0		14,0		24,3		33,3		38,0		46,4		56,2		62,6	

Tabelle IIIa (Abb. 3).

Spaltungszeit in Minuten	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
15	14,0	86,0	10,85
30	24,5	75,5	10,80
45	33,3	66,7	11,05
60	38,0	62,0	10,22
90	49,0	51,0	10,68
120	56,2	43,8	10,65
150	62,6	37,4	11,15
		Im Durchschnitt . .	$10,78_6$

Versuch 4. 20 ccm Substrat, 10 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Fermentlösung (1 : 28000). p_H 2,57.

Tabelle IV.

Zeit in Minuten	0		30		60		90		120		150	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,2	22,4	22,2	24,2	24,2	28,0	27,8	28,8	28,8	29,8	29,8
	20,0	19,8	22,6	22,5	24,0	24,0	28,1	27,7	28,7	28,7	29,9	29,9
	20,0	20,0	22,7	22,2	24,0	24,4	27,9	27,8	28,7	28,7	29,9	29,9
Durchschnitt . .	20		22,4		24,3		27,8		28,7		29,9	
Verglichen mit . .	Ia = 20		20		20		20		20		20	
Spaltung in Proz. .	0		10,7		17,7		26,1		30,3		33,1	

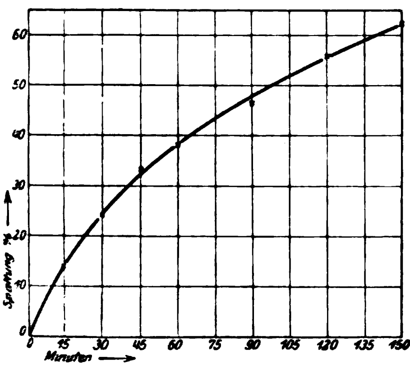


Abb. 3.

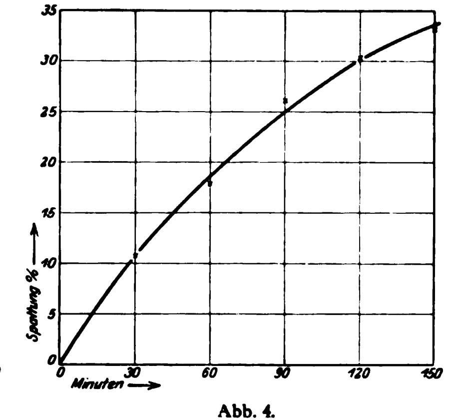


Abb. 4.

Tabelle IVa (Abb. 4).

Spaltungszeit in Minuten	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
30	10,0	90,0	3,71
60	18,5	81,5	3,78
90	26,0	74,0	3,91
120	30,5	69,5	3,66
150	32,6	67,4	3,22
		Im Durchschnitt . .	3,56

Versuch 5. 20 ccm Substrat, 12 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Fermentlösung (1 : 14000). p_H 2,43.

Tabelle V.

Zeit in Minuten	0		30		60		90		120		150		180	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	19,8	25,8	25,4	30,8	30,8	34,4	34,0	38,4	38,4	34,4	34,4	36,6	35,0
	20,0	20,0	25,8	25,3	30,6	30,6	34,6	34,2	38,4	38,4	34,7	34,7	36,5	34,8
	20,0	19,9	25,7	25,4	30,5	30,5	34,3	34,1	38,6	38,6	34,4	34,4	36,4	34,8
Durchschnitt . . .	19,9		25,6		30,6		34,3		38,5		34,5		35,4	
Verglichen mit . . .	Ia = 20		20		20		20		20		15		15	
Spaltung in Proz. .	0,5		21,9		34,6		41,4		48,1		56,5		57,9	

Tabelle V a (Abb. 5).

Spaltungszeit in Minuten	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\,\frac{x}{(a-x)\,a} = k\,.\,10^5$
30	21,0	79,0	8,87
60	33,0	67,0	8,23
90	41,5	58,5	7,90
120	48,5	51,0	7,89
150	54,0	46,0	7,82
180	58,0	42,0	7,68
		Im Durchschnitt . .	8,08

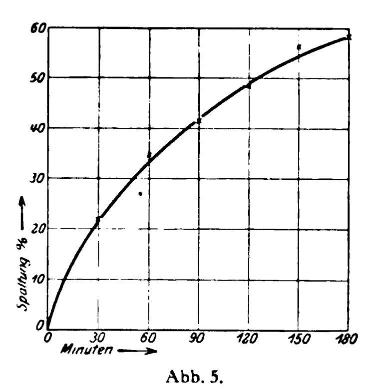


Abb. 5.

II.

Natürlich kann der Beweis für die Berechtigung der Anwendung der (äqui)-bimolekularen Reaktionsformel nur durch Variierung der Substratkonzentration erbracht werden, da die nach dieser Formel berechnete Konstante sich umgekehrt proportional dieser Konzentration ändern muß. Dies ist, wie die folgenden Versuche zeigen, tatsächlich der Fall. In dem sechsten Versuch verhalten sich die Substratmengen wie 1 : 4, die Reaktionskonstanten bzw. wie 4 : 1; in dem siebenten Versuch verhalten sich die Substratmengen wie 1 : 1,5 : 3, die Reaktionskonstanten bzw. wie 2,9 : 1,4 : 1,0; in dem achten Versuch verhalten sich die Substratkonzentrationen wie 1 : 1,5 : 2, die Reaktionskonstanten bzw. wie 1,73 : 1,33 : 1,0.

Versuch 6. I. 4 ccm Albuminlösung, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 27000). p_H 2,32. — II. 16 ccm

Tabelle VI.

Zeit in Minuten	0				15				30				60			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	20,0	20,1	24,0	24,2	21,0	21,3	27,0	26,8	21,1	21,8	30,5	31,2	23,5	23,5
	20,0	19,8	20,0	19,9	24,0	24,5	21,0	21,1	27,2	27,1	21,0	21,9	30,3	31,5	23,3	23,2
	20,0	19,9	20,0	19,9	23,8	24,2	21,1	21,1	27,2	26,8	21,1	21,8	30,2	31,2	23,5	23,3
Durchschnitt	19,9		20,0		24,1		21,1		26,9		21,5		30,8		24,4	
Verglichen mit	I = 20		II = 20		I = 20		II = 20		I = 20		II = 20		I = 20		II = 20	
Spaltung in Proz.	0,5		0		17,0		5,2		25,6		7,0		35,1		14,5	

Zeit in Minuten	90				120				150				180			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	37,0	36,9	25,2	24,3	32,1	32,6	25,1	26,6	39,6	41,0	27,3	27,8	28,5	28,2	28,2	28,3
	36,9	36,8	25,2	24,1	32,4	32,4	25,1	26,6	39,7	40,9	27,3	27,5	28,5	28,2	27,9	28,0
	37,0	36,9	25,2	24,1	32,4	32,4	25,1	26,5	39,5	40,9	27,1	27,7	28,5	28,4	27,9	28,2
Durchschnitt	36,9		24,7		32,4		25,8		40,3		27,5		28,4		28,1	
Verglichen mit	I = 20		II = 20		I = 15		II = 20		I = 15		II = 20		I = 10		II = 20	
Spaltung in Proz.	45,8		19,0		53,7		22,5		62,8		27,3		64,8		28,8	

Albuminlösung, 18,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 27 000). p_H 2,39.

Tabelle VIa (Abb. 6).

Spaltungszeit in Minuten	I.			II.		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
15	15,0	85,0	11,75	3,5	96,5	2,41
30	23,5	76,5	10,22	7,0	93,0	2,50$_5$
60	36,0	64,0	9,38	13,5	86,5	2,60
90	46,0	54,0	9,46	18,0	82,0	2,72
120	53,5	46,5	9,60	23,0	77,0	2,49
150	60,0	40,0	10,00	27,5	72,5	2,51$_5$
180	65,0	35,0	10,30	31,5	68,5	2,55
	Im Durchschnitt . .		10,07	Durchschnitt . .		2,50

Versuch 7. I. 4 ccm Albuminlösung, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,31. — II. 6 ccm Albuminlösung, 13,75 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,34. — III. 12 ccm Albuminlösung, 16,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,34.

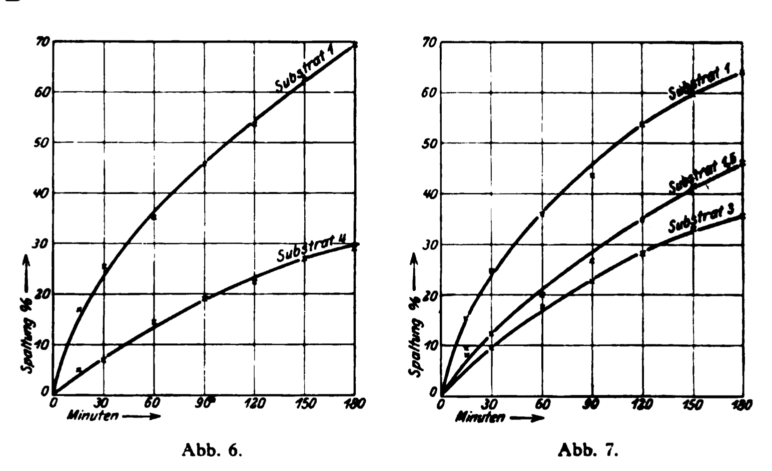


Abb. 6. Abb. 7.

Versuch 8. I. 15 ccm Substrat (Albumin 4 : 10), 16,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 69 ccm. 6 ccm Ferment (1 : 29000). p_H 2,38. — II. 10 ccm Substrat (Albumin 6 : 10), 12 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 29000). p_H 2,33. — III. 10 ccm Substrat

Tabelle VII.

Zeit in Min.	0						15						30						60					
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
Nephelometrische Ablesung	20,0	19,9	20,0	19,8	20,0	20,0	22,7	23,7	22,0	21,9	21,9	—	26,7	26,7	22,8	22,8	22,2	—	30,9	31,2	25,1	25,0	24,3	24,1
	20,0	20,0	20,0	19,9	20,0	20,0	22,9	23,8	22,3	22,1	21,9	—	26,5	26,6	22,7	22,8	22,2	—	30,8	31,1	24,8	24,9	24,2	24,3
	20,0	20,2	20,0	19,9	20,0	20,0	22,8	23,5	22,2	22,0	21,9	—	26,6	26,6	22,9	22,8	22,2	—	30,8	31,4	24,9	25,1	24,3	24,3
Durchschn.	20		19,9		20		23,2		22,8		21,9		26,6		22,8		22,2		31,1		24,9		24,3	
Verglich. mit	I = 20		II = 20		III = 20		I = 20		II = 20		III = 20		I = 20		II = 20		III = 20		I = 20		II = 20		III = 20	
Spaltg., Proz.	0		0,5		0		15,8		9,5		8,7		24,8		12,3		9,9		35,7		19,7		17,7	

Zeit in Min.	90						120						150						180					
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
Nephelometrische Ablesung	33,8	37,4	27,1	27,4	26,0	26,0	41,5	34,1	30,7	30,7	27,0	28,1	37,2	—	34,0	34,0	29,9	29,9	39,0	30,0	36,9	37,2	31,0	30,8
	33,8	37,1	27,0	27,3	25,8	25,8	41,6	34,0	30,9	30,6	26,8	28,2	37,1	—	34,2	34,2	29,9	29,9	38,9	30,2	36,6	36,9	31,0	31,2
	33,7	37,3	27,0	27,4	25,9	25,9	41,6	34,2	30,9	30,6	27,1	28,0	37,2	—	34,1	34,1	29,8	29,8	38,9	29,8	36,6	37,2	31,3	31,0
Durchschn.	35,5		27,2		25,9		41,6	34,1	30,7		27,7		37,2		34,1		29,9		38,9	30,0	36,9		31,0	
Verglich. mit	I = 20		II = 20		III = 20		I=20	I=15	II = 20		III = 20		I = 15		II = 20		III = 20		I=15	I=10	II = 20		III = 20	
Spaltg., Proz.	43,6		26,5		22,8		53,9		34,9		28,1		59,7		41,3		33,1		64,1		45,8		35,5	

Tabelle VII a (Abb. 7).

Zeit	I. Substrat 1,0			II. Substrat 1,5			III. Substrat 3,0		
Minuten	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a}=k.10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a}=k.10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{a}{(a-x)a}=k.10^5$
15	—	—	—	7,0	93,0	4,94	4,5	95,5	3,14
30	24,8	75,2	10,90	12,5	87,5	4,76	9,9	90,1	3,66
60	35,7	64,3	9,30	20,5	79,5	4,32	17,7	82,3	3,59
90	46,4	53,6	9,60	28,0	72,0	4,33	22,8	77,2	3,28
120	52,8	47,2	9,36	34,9	65,1	4,47	28,1	71,9	3,26
150	59,7	40,3	9,88	41,3	58,7	4,68	33,1	66,9	3,30
180	64,1	35,9	9,93	45,8	54,2	4,69	35,5	64,5	3,06
	Im Durchschnitt . . .		9,73	Im Durchschnitt . . .		4,60	Im Durchschnitt . . .		3,33

(Albumin 8 : 10), 13,75 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 29000). p_H 2,34.

Tabelle VIIIa (Abb. 8).

Zeit in Minuten	I. Substrat 1,0			II. Substrat 1,5			III. Substrat 2,0		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
20	15,0	85,0	8,74	12,0	88,0	6,80	8,0	92,0	4,34
40	26,0	74,0	8,78	21,0	79,0	6,64	16,5	83,5	4,92
60	34,0	66,0	8,58	27,5	72,5	6,32	23,0	77,0	4,92
80	40,0	60,0	8,35	33,0	67,0	6,15	28,5	71,5	4,82
100	44,5	55,5	8,00	38,5	61,5	6,27	34,0	66,0	5,15
120	48,5	51,5	7,85	43,0	57,0	6,28	37,5	62,5	4,46
140	53,0	47,0	8,10	47,0	53,0	6,33	41,0	59,0	4,96
160	57,0	43,0	8,29	50,0	50,0	6,25	43,5	56,5	4,90
180	60,0	40,0	8,30	53,0	47,0	6,27	46,0	54,0	4,73
Im Durchschnitt . .			8,33	—	—	6,37	—	—	4,81

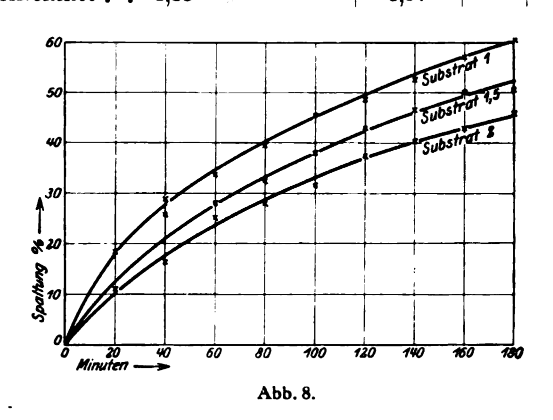


Abb. 8.

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß der Verlauf der peptischen Albuminspaltung unter den gegebenen Bedingungen durch die Formel der (äqui)-bimolekularen Reaktion mit befriedigender Genauigkeit darstellbar ist. Diese Gesetzmäßigkeit hat vorläufig nur einen rein formalen Wert. Ob sie auch geeignet ist, über das Wesen des chemischen Spaltungsvorgangs Aufklärung zu geben, müssen erst weitere Erfahrungen lehren.

III.

Frühere Versuche haben bereits ergeben, daß bei gleichem Eiweißumsatz die Spaltungszeiten sich umgekehrt proportional den Fermentmengen verhalten[1]). Dies zeigt auch der folgende Versuch, bei dem

[1]) Vgl. *P. Rona* und *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **140**, 478, 1923.

Tabelle VIII.

Zeit in Min.	0						20						40						60					
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	20,0	19,9	—	—	24,6	24,4	—	—	22,5	22,5	27,7	27,9	26,9	27,2	24,1	24,1	30,1	30,1	27,8	27,7	26,7	26,7
	20,0	20,0	20,0	20,0	—	—	24,5	24,6	—	—	22,4	22,6	27,8	28,1	26,9	27,2	23,9	23,9	30,3	30,3	27,8	28,0	27,0	27,0
	20,0	20,0	20,0	20,0	—	—	24,5	24,6	—	—	22,6	22,4	27,7	27,9	27,0	27,2	23,9	23,9	30,2	30,2	28,0	27,9	26,8	26,8
Durchschn.	20,0		20,0		—		24,5		—		22,5		27,8		27,1		23,9		30,2		27,8		26,8	
Verglich. mit	I = 20		II = 20		II = 20		I = 20		—		II = 20		I = 20		II = 20		II = 20		I = 20		II = 20		II = 20	
Spaltg., Proz.	0		0		0		18,4		—		11,1		28,0		25,9		16,3		33,8		28,1		25,4	

Zeit in Min.	80						100						120						140					
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
Nephelometrische Ablesung	33,2	33,2	29,7	29,7	28,1	27,8	35,1	36,8	32,0	32,0	29,2	—	—	39,1	35,1	—	31,5	31,7	31,9	31,9	37,6	37,6	34,4	33,6
	33,3	33,3	29,8	29,8	28,0	27,7	35,0	37,1	32,1	32,1	29,0	—	—	39,1	35,2	—	31,9	31,7	32,0	31,9	37,4	37,4	33,6	33,4
	33,3	33,3	29,8	29,8	28,0	27,7	35,0	37,2	32,3	32,3	29,2	—	—	39,1	35,1	—	31,9	31,9	31,8	31,8	37,5	37,5	36,6	33,6
Durchschn.	33,2		29,7		27,9		37,0		32,1		29,1		39,1		35,1		31,9		31,8		37,5		33,5	
Verglich. mit	I = 20		II = 20		II = 20		I = 20		II = 20		II = 20		I = 20		II = 20		II = 20		I = 15		II = 20		II = 20	
Spaltg., Proz.	39,9		32,7		28,1		45,9		37,7		31,5		48,7		43,0		37,3		52,8		46,6		40,3	

Zeit in Min.	160						180					
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
Nephelometrische Ablesung	35,1	35,3	40,0	40,1	35,2	35,2	38,0	—	40,0	40,3	37,2	37,2
	35,2	35,3	40,0	40,2	35,2	35,2	37,9	—	40,0	40,2	37,0	37,0
	35,1	35,5	40,0	40,2	35,4	35,4	38,0	—	40,0	40,3	37,0	37,0
Durchschn.	35,3		40,1		35,2		38,0		40,2		37,0	
Verglich. mit	I = 15		II = 20		II = 20		I = 15		II = 20		II = 20	
Spaltg., Proz.	57,5		50,2		43,2		60,5		50,3		45,9	

sich die Fermentmengen wie 4 : 5, die Zeiten gleichen Umsatzes wie 5 : 4 verhielten.

Versuch 9. I. 4 ccm Albuminlösung, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4,0 ccm Ferment (1 : 25000). p_H 2,33. — II. 4 ccm Albuminlösung, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4,0 ccm Ferment (1 : 20000). p_H 2,32.

Tabelle IX.

I.

Zeit in Minuten	0		20		40		60		80		100	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	26,7	26,5	32,3	32,5	39,8	39,7	41,1	41,4	38.1	37.7
	20,0	20,0	26,5	26,6	32,4	32,4	39.8	39,7	41,3	41,4	38.2	37.8
	20,0	20,0	26,5	26,7	32,3	32,4	39,8	39,8	41,2	41,3	38.1	37.9
Durchschnitt . .	20,0		26.6		32,4		39,8		41,3		38,0	
Verglichen mit . .	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 15	
Spaltung in Proz. .	0		24,8		38,5		49,6		51,5		60.5	

II.

Zeit in Minuten	0		20		40		60		80	
Nr.	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	28,1	28,3	36,5	36,7	37,5	37,7	42,3	42,4
	20,0	20,0	28,0	28,3	36,4	36,7	37,6	37,6	42.3	42.5
	20,0	20,0	28,1	28,2	36,5	36,8	37,5	37,6	42.2	42,5
Durchschnitt	20,0		28,2		36,6		37,6		42.4	
Verglichen mit . . .	IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 15		IIa = 15	
Spaltung in Proz. . .	0		29,3		45,5		60,0		64.6	

Tabelle IX a.

Zeit in Minuten	I			II		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k_1 \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k_2 \cdot 10^5$
20	24,8	75,2	16,49	29,3	70,7	20,66
40	38,5	61,5	15,69	45,5	54,5	20,69
60	49,6	50,4	16,92	55,5	44,5	20,69
80	56,0	44,0	15,90	62,4	37,5	20,69
100	60,5	39,5	15,31	—	—	—
Im Durchschnitt . .			16,05	—	—	20,68

Die durch die Konstante k ausgedrückten Reaktionsgeschwindigkeiten sind demnach proportional der Fermentkonzentration. Da die Konstanten der Substratmengen umgekehrt proportional gefunden wurden, müssen diese Konstanten bei gleicher Änderung der Substrat- und der Fermentkonzentration, also z. B. bei Verdopplung oder Ver-

dreifachung beider, gleich bleiben. Dies ist tatsächlich der Fall. In dem folgenden Versuch 11 ist ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit der Ferment-Substratkonzentration 1 mit der der dreifachen Ferment- und der dreifachen Substratmenge durchgeführt, in dem Versuch 12 ein Vergleich mit der vierfachen Ferment- und der vierfachen Substratkonzentration.

Versuch 10. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment 1, Verdünnung 1 : 27000. p_H 2,33. — II. 12 ccm Albumin, 16,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment 2, Verdünnung 1 : 9000. p_H 2,31.

Tabelle Xa (Abb. 9).

Zeit in Minuten	I. Substrat 1. Ferment 1			II. Substrat 3. Ferment 3		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a} = k \cdot 10^5$
15	12,5	87,5	9,55	11,5	88,5	8,67
30	21,9	78,1	9,39	20,4	79,6	8,45
45	28,2	71,8	8,75	28,0	72,0	8,67
60	36,1	63,9	9,45	35,5	64,5	9,20
90	46,4	53,6	9,64	45,5	54,5	9,20
120	54,5	45,5	10,00	55,9	44,1	10,55
150	60,7	39,3	10,31	59,5	40,5	9,82
Im Durchschnitt . .			9,15₆	—	—	9,22

Abb. 9.

Versuch 11. I. Substratmenge 1, Fermentmenge 1. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000).

p_H 2,34. — II. Substratmenge 4, Fermentmenge 4. 16 ccm Albumin, 19 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 7000).

Tabelle XIa (Abb. 10).

Spaltungszeit in Minuten	I. Substrat 1. Ferment 1			II. Substrat 4. Ferment 4		
	x	$a - x$	$\frac{1}{t} \frac{x}{(a-x)a} = k_1 \cdot 10^5$	x	$a - x$	$\frac{1}{t} \frac{x}{(a-x)a} = k_2 \cdot 10^5$
15	15,0	85,0	11,72	Abb. 2 deckt sich praktisch mit Abb. 1		
30	26,0	74,0	11,75			
45	34,0	66,0	11,50			
60	40,0	60,0	11,12			
90	49,0	51,0	10,65			
120	56,5	43,5	10,85			
150	62,0	38,0	10,85			
Im Durchschnitt . .			11,21			

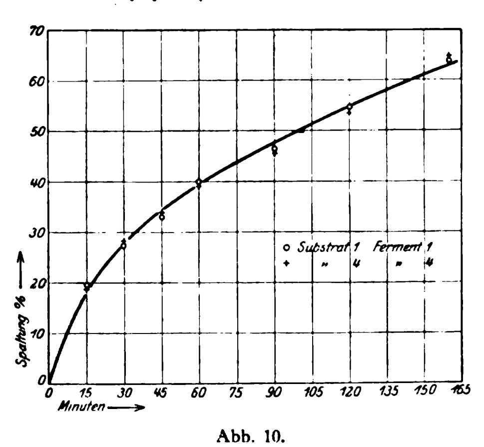


Abb. 10.

Wie man sieht, bleibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei gleicher Änderung der Substrat- und der Fermentkonzentration dieselbe. Kennt man demnach den Reaktionsverlauf für eine Substrat- und eine Fermentkonzentration, so kann man diesen innerhalb des geprüften Konzentrationsbereiches für alle Substrat- und Fermentkonzentrationen berechnen.

IV.

Über die Abhängigkeit der peptischen Spaltung von der H-Ionenkonzentration sind wir bereits gut unterrichtet, und unsere Befunde in dieser Richtung stehen mit früheren Angaben in bester Übereinstimmung. Hier interessierte uns die Frage, ob der Verlauf der fermentativen Spaltung auch im nicht optimalen H-Gebiete durch die Formel einer bimolekularen Reaktion darstellbar ist, und welche Beziehungen zwischen den so erhaltenen Konstanten und den H-Ionenkonzentrationen bestehen.

Tabelle X.

Zeit in Minuten	0				15				30				45			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	20,0	19,8	20,0	20,0	23,3	23,4	22,5	22,4	25,5	26,0	25,2	24,1	28,3	28,3	28,2	28,0
	20,0	20,0	20,0	20,0	23,5	23,7	22,6	22,6	25,5	25,7	25,0	25,2	28,2	28,1	27,9	28,3
	20,0	19,8	20,0	20,0	23,5	23,4	22,5	22,5	25,5	25,7	25,0	25,2	28,2	28,2	27,9	28,0
Durchschnitt	19,9		20		23,5		22,6		25,6		25,1		28,2		28,0	
Verglichen mit	I = 20		I = 20		I = 20		II = 20		I = 20		II = 20		I = 20		II = 20	
Spaltung in Proz.	0,5		0		14,9		11,5		21,9		20,4		29,1		28,6	

Zeit in Minuten	60				90				120				150			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	31,2	—	29,7	—	37,2	37,6	36,2	36,2	43,6	42,6	34,0	34,0	38,5	38,0	—	43,5
	31,4	—	29,7	—	37,1	37,4	36,4	35,9	43,6	42,7	34,1	34,1	38,3	37,8	—	43,8
	31,1	—	29,7	—	36,8	37,5	36,3	36,1	43,4	42,7	34,0	34,0	38,4	37,8	—	43,6
Durchschnitt	31,3		29,7		37,3		36,2		43,1		34,0		38,0		43,7	
Verglichen mit	I = 20		I = 20		I = 20		II = 20		I = 20		II = 15		I = 15		II = 15	
Spaltung in Proz.	36,1		32,8		46,4		44,8		53,6		55,9		60,7		65,7	

Tabelle XI.

Zeit in Minuten	0				15				30				45			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	20,0	20,0	24,9	25,1	24,4	24,9	27,0	28,1	28,0	27,7	29,7	30,4	30,4	—
	20,0	20,0	20,0	20,0	24,8	24,9	24,3	24,9	27,0	28,3	28,1	27,7	29,9	30,1	30,0	—
	20,0	20,0	20,0	20,0	25,0	25,0	24,3	24,8	27,0	28,1	28,1	27,7	29,6	30,4	30,3	—
Durchschnitt	20,0		20,0		24,9		24,6		27,6		27,9		30,0		30,3	
Verglichen mit	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		IIa = 20		Ia = 20		IIa = 20		Ia = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	0		0		19,7		18,7		27,5		28,2		33,4		34,0	

Zeit in Minuten	60				90				120				150			
Nr.	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb	Ia	Ib	IIa	IIb
Nephelometrische Ablesung	32,7	33,9	32,9	32,9	38,7	38,6	38,1	38,2	34,0	33,1	31,9	32,7	—	42,4	42,5	42,4
	32,5	34,1	32,9	32,9	38,4	38,8	38,3	37,9	34,0	33,1	32,0	32,6	—	42,2	42,7	42,5
	32,5	33,9	32,9	32,9	38,4	38,6	38,0	38,2	34,0	33,1	32,0	32,7	—	42,2	42,6	42,5
Durchschnitt	33,3		32,9		38,6		38,1		33,4		32,3		42,2		42,5	
Verglichen mit	Ia = 20		IIa = 20		Ia = 20		IIa = 20		I = 15		I = 15		I = 15		II = 15	
Spaltung in Proz.	40,1		39,1		47,0		46,2		55,1		53,6		64,2		64,7	

Es zeigte sich, daß bei Variation des H-Ionengehalts vom Optimum, etwa $p_H = 2,3$ nach der alkalischen Seite bis zu dem untersuchten $p_H = 3,16$ alle Spaltungskurven sich befriedigend durch die Formel der bimolekularen Reaktion darstellen lassen, während nach der sauren Seite (p_H 1,78, 1,2) die entsprechenden Reaktionskonstanten stark sanken und die bimolekulare Formel nicht anwendbar war. Diese Erscheinung ließ sich, wie weiter unten dargestellt werden soll, auf eine Schädigung des Ferments auf der sauren Seite des Optimums zurückführen.

Die folgenden Versuche (12 bis 16) prüfen die Beziehung zwischen der H-Ionenkonzentration und der *Kinetik* bzw. den Reaktionskonstanten.

Versuch 12. I. 4 ccm Albumin, 11,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,40. — II. 4 ccm Albumin, 13,6 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1: 40000). p_H 2,30. — III. 4 ccm Albumin, 16,0 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 40000). p_H 2,21.

Tabelle XII.

Spaltungszeit in Minuten	I. p_H 2,40			II. p_H 2,30			III. p_H 2,21		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
15	11,5	88,5	8,67	9,0	91,0	6,57	9,0	9,10	6,57
30	21,3	78,7	9,00	17,5	82,5	7,06	12,5	8,25	7,06
45	27,6	72,4	8,45	24,0	76,0	7,03	23,8	7,62	6,94
60	32,5	67,5	8,04	28,3	71,7	6,57	28,3	7,17	6,60
90	40,0	60,0	7,44	35,1	64,9	6,03	35,1	6,49	6,03
Im Durchschnitt . .			8,32	—	—	6,55	—	—	6,64

Die Fermentkonzentrationen der Reihe verhalten sich wie 1,4 : 1 : 1, die entsprechenden Konstanten demnach wie 5,82 : 6,55 : 6,64 und die zugehörigen H'-Konzentrationen wie $3,98 \cdot 10^{-3} : 5,01 \cdot 10^{-3} : 6,16 \cdot 10^{-3}$.

Versuch 13. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 27000). p_H 2,38. — II. 4 ccm Albumin, 6,5 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 10000). p_H 2,65.

Tabelle XIII.

Spaltungszeit in Minuten	I. p_H 2,38			II. p_H 2,65		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
15	14,5	85,5	11,32	17,6	82,4	14,00
30	24,0	76,0	10,50	27,5	72,5	12,65
45	32,2	67,8	10,55	35,0	65,0	11,95
60	39,0	61,0	10,63	42,5	57,5	12,30
90	49,0	51,0	10,65	53,6	46,4	12,85
120	56,0	44,0	10,60	62,5	37,5	13,90
150	61,2	38,8	10,55	—	—	—
Im Durchschnitt . .			10,70	—	—	12,94

Die Fermentkonzentrationen der Reihe verhalten sich wie 1 : 2,7, die entsprechenden Konstanten demnach wie 2,23 : 1 und die zugehörigen H'-Konzentrationen wie 4,17 . 10^{-3} : 2,24 . 10^{-3}, d. h. wie 1,86 : 1.

Versuch 14. I. 4 ccm Albumin, 11,0 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,38. — II. 4 ccm Albumin, 7,6 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 15000). p_H 2,58.

Tabelle XIV.

Spaltungszeit in Minuten	I. p_H 2,36 x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k\,.\,10^5$	II. p_H 2,58 x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k\,.\,10^5$
15	17,0	83,0	13,62	14,1	85,9	10,95
30	27,0	73,0	12,63	25,8	74,2	11,55
45	35,7	64,3	12,60	35,8	64,2	12,35
60	41,2	58,8	11,65	42,7	57,3	12,40
90	49,7	50,3	11,00	52,1	47,9	12,10
120	56,5	43,5	10,82	59,2	40,8	12,10
150	63,3	36,7	11,45	—	—	—
Im Durchschnitt . .			11,97	—	—	11,91

Die Fermentkonzentrationen der Reihe verhalten sich wie 1 : 1,87, die entsprechenden Konstanten demnach wie 1,88 : 1 und die zugehörigen H'-Konzentrationen wie 4,36 . 10^{-3} : 2,63 . 10^{-3}, d. h. wie 1,66 : 1.

Versuch 15. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 27000). p_H 2,38. — II. 4 ccm Albumin, 6 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 10000). p_H 2,75.

Tabelle XV.

Spaltungszeit in Minuten	I. p_H 2,38 x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k\,.\,10^5$	II. p_H 2,75 x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k\,.\,10^5$
15	14,5	85,5	11,28	9,5	90,5	7,00
30	25,0	75,0	11,10	18,5	81,5	7,56
45	32,5	67,5	10,70	27,0	73,0	7,67
60	39,0	61,0	10,62	31,5	68,5	7,80
90	46,5	53,5	9,65	41,0	59,0	7,72
Im Durchschnitt . .			10,59	—	—	7,55

Die Fermentkonzentrationen der Reihe verhalten sich wie 1 : 2,7, die entsprechenden Konstanten demnach wie 3,78 : 1 und die zugehörigen H'-Konzentrationen wie 4,17 . 10^{-3} : 1,7 . 10^{-3}, d. h. 1,78 : 1.

Versuch 16. I 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,38. — II. 4 ccm Albumin,

3,7 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46,0 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 4500). p_H 2,98.

Tabelle XVI.

Spaltungszeit in Minuten	I. p_H 2,38			II. p_H 2,98		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)a} = k \cdot 10^5$
15	11,5	88,5	8,66	10,0	90,0	7,41
30	20,0	80,0	8,34	19,0	81,0	7,82
45	28,2	71,8	8,73	26,0	74,0	7,82
60	33,9	66,1	8,52	31,2	68,8	7,66
90	44,6	55,4	8,98	40,0	60,0	7,43
120	52,3	47,7	9,14	46,0	54,0	7,10
150	58,0	42,0	9,20	51,3	48,7	7,02
Im Durchschnitt . .			8,80	—	—	7,45

Die Fermentkonzentrationen der Reihe verhalten sich wie 1 : 6,22, die entsprechenden Konstanten demnach wie 7,5 : 1 und die zugehörigen H'-Konzentrationen wie 4,17 . 10^{-3} : 1,05 . 10^{-3}, d. h. wie 4 : 1.

In Abb. 11 ist zusammenfassend das Ergebnis der Versuche 12 bis 16 dargestellt. Dabei sind die Konstanten der Ausgangsvergleichlösungen, die angenähert das p_H 2,38 hatten, gleich 100 gesetzt. Ein geringer Fehler, da die verschiedenen Versuche nicht stets genau im p_H 2,38 übereinstimmten, war technisch nicht zu vermeiden. Es wurde nun, wie aus den obigen Versuchen ersichtlich ist, für jeden Versuch mit einer gegenüber der Ausgangslösung (p_H 2,38) variierten H'-Konzentration diejenige Konstante festgestellt, die der betreffenden H'-Konzentration entspricht. Dabei zeigte sich, daß auch bei nicht optimaler

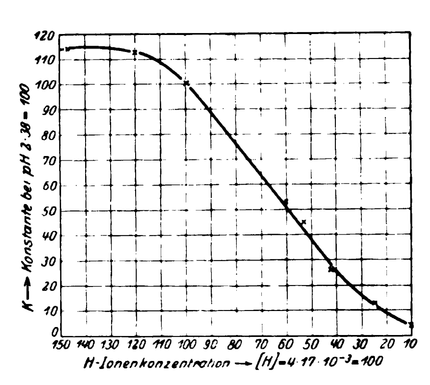


Abb. 11.

[H'], auf der alkalischen Seite davon, der Verlauf der Spaltung durch die bimolekulare Reaktionsformel dargestellt werden kann. Da bei den schwächeren Aciditäten weit größere Fermentmengen zur Spaltung nötig waren als bei der Vergleichslösung, so mußten die aus dem Versuch erhaltenen Konstanten erst durch die betreffende Fermentkonzentration dividiert werden, um diejenigen Konstanten zu erhalten, die sich auf gleiche Fermentkonzentrationen beziehen. Die so erhaltenen Konstantenzahlen (ausgedrückt in Prozenten der Ausgangsvergleichslösungen bei p_H 2,38) sind auf der Ordinate der Abb. 11 aufgetragen. Auf die Abszisse wurden die H'-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozenten von [H'] = 4,17 . 10^{-3}, aufgetragen. Die so erhaltene Kurve zeigt im Gebiete des Optimums

einen nahezu horizontalen Verlauf, d. h. um das (schmale) Optimum selbst ändern die Variationen der H˙-Konzentration die Konstante kaum, um dann nach der sauren Seite steil, nach der alkalischen flacher abzufallen. Es ist bemerkenswert, daß ein Teil dieser absteigenden Kurve — rund zwischen einer H von $4{,}17 \cdot 10^{-3}$ und $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ — in großer Annäherung einer geraden Linie entspricht. Das heißt, in diesem Abschnitt ist in großer Annäherung (unter Berücksichtigung der verhältnismäßig großen Fehlergrenzen der experimentellen Daten) die Konstante der Spaltungsgeschwindigkeit der H˙-Konzentration direkt proportional.

Des weiteren zeigt die Kurve, daß die Konstante in einem Gebiete um [H˙] $= 5 \cdot 10^{-5}$, also in der Gegend des isoelektrischen Punktes des Serumalbumins, gegen Null konvergiert. Diesbezügliche genauere Untersuchungen werden in späteren Arbeiten gegeben werden.

V.

Da die nach der bimolekularen Reaktion berechneten Konstanten auf der sauren Seite des H˙-Optimums stark abfallen, lag es nahe anzunehmen, daß die zu hohe H˙-Konzentration eine schädliche Wirkung auf das Ferment ausübt. Um diese Annahme zu prüfen, wurde eine Reihe von Versuchen angesetzt, die die Wirksamkeit der Pepsinlösung vor und nach mehrstündigem Stehen bei verschiedenen Aciditäten untersuchten. Die Versuche erstreckten sich auf Lösungen bei einem p_H von 2,5, 2,39, 2,0, 1,77, 1,72. Ein Teil der Substratlösungen wurde unmittelbar nach Herstellung der sauren Fermentlösung mit dieser versetzt und die Spaltung etwa ½ Stunde hindurch verfolgt; sodann wurde nach ½ Stunde bzw. nach 2 Stunden mit der gleichen Substrat- und der gleichen Fermentlösung eine zweite Spaltung angesetzt, die sich von der ersten nur dadurch unterschied, daß das Ferment inzwischen ½ bzw. 2 Stunden bei der betreffenden Reaktion bei 40° gestanden hatte.

Versuch 17. I. 2 ccm Albumin + n/200 HCl zu 23 ccm. Ferment (mit n/200 HCl 1 : 50000 verdünnt) gleich zugefügt. p_H 2,4. — II. 2 ccm Albumin + n/200 HCl zu 23 ccm. Ferment (mit n/200 HCl 1 : 50000 verdünnt) nach 30 Minuten langem Stehen im Wasserbad bei 40° zugefügt. p_H 2,4.

Tabelle XVII.

	I.				II.			
Zeit in Minuten	0		30		0		30	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	25,5	25,5	20,6	20,6	25,5	25,6
	20,0	20,0	25,4	25,4	20,4	20,5	25,4	25,4
	20,0	20,0	25,5	25,5	20,5	20,7	25,5	25,6
Durchschnitt . . .	20,0		25,5		20,5		25,5	
Verglichen mit . . .	I = 20		I = 20		I = 20		I = 20	
Spaltung in Proz. .	0		21,6		2,5		21,6	

Versuch 18. I. Substrat (A): 12 ccm Albumin + 6,7 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 138 ccm. p_H 2,40. Fermentlösung (A) 1 : 27000. Mit verdünnter HCl auf p_H 2,36 gebracht. Zu dem Versuch: 23 ccm Substrat A + 2 ccm Fermentlösung A. — II. Substrat (B): 12 ccm Albumin + 33 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 138 ccm. p_H 1,71. Fermentlösung (B) 1 : 34000. Mit verdünnter HCl auf p_H 1,76 gebracht. Zu dem Versuch: 23 ccm Substrat B + 2 ccm Fermentlösung B.

Tabelle XVIII (Abb. 12).

α) Spaltung nach sofortiger Zugabe der Fermentlösung.

	I. p_H 2,38						II. p_H 1,71					
Zeit in Minuten	0		15		30		0		15		30	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,9	22,9	22,9	25,7	25,3	20,0	19,5	27,3	27,4	28,0	28,7
	20,0	20,9	23,1	23,0	25,8	25,5	20,0	19,6	27,4	27,3	27,4	28,5
	20,0	20,9	23,1	22,9	25,7	25,4	20,0	19,5	27,3	27,3	27,9	28,6
Durchschnitt . .	20,4		23,0		25,6		19,8		27,3		28,3	
Verglichen mit . .	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	2		12,9		21,8		1,0		26,6		29,3	

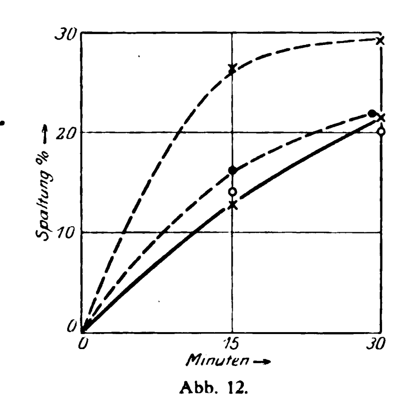


Abb. 12.

——— p_H 2,38. - - - - - p_H 1,71. × Ferment sofort zugefügt.
o Ferment nach 2 Stunden zugefügt.

β) Spaltung nach Zugabe der Fermentlösung, die 2 Stunden bei 40° gestanden hatte.

	I. p_H 2,38						II. p_H 1,71					
Zeit in Minuten	0		15		30		0		15		30	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,2	22,9	—	24,9	25,1	20,0	19,8	24,0	23,8	25,6	25,5
	20,0	20,1	23,1	—	24,9	25,0	20,0	19,9	24,0	24,1	25,9	25,3
	20,0	20,2	23,1	—	25,1	25,0	20,0	19,8	24,0	24,0	25,7	25,3
Durchschnitt . .	20,1		23,1		25,0		19,9		24,0		25,6	
Verglichen mit . .	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	0,5		13,4		20,0		0,1		16,6		21,8	

Versuch 19. Substrat: 2 ccm Albumin + n/200 HCl zu 23 ccm. Ferment mit n/200 HCl 1 : 50000. p_H 2,0. I. 23 ccm Substrat + 2 ccm Ferment sofort. — II. 23 ccm Substrat + 2 ccm Ferment nach einstündigem Stehen bei 40°.

Tabelle XIX.

	I. p_H 2,0			II. p_H 2,0		
Zeit in Minuten	0	15	30	0	15	30
Nephelometrische Ablesung	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0 20,0	32,7 31,6 32,8 31,8 32,9 31,7	37,6 37,4 37,4 37,3 37,3 37,4	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0 20,0	32,0 31,4 31,9 31,4 32,0 31,5	34,0 34,5 34,1 34,4 33,9 34,5
Durchschnitt . .	20,0	32,2	37,4	20,0	31,7	34,2
Verglichen mit . .	I = 20	I = 20	I = 20	I = 20	I = 20	I = 20
Spaltung in Proz.	0	37,9	46,5	0	36,9	41,5

Versuch 20. I. 2 ccm Albumin + n/200 HCl zu 23 ccm, 2 ccm Ferment (mit n/200 HCl 1 : 50000). p_H 2,0. — II. Wie in I. — III. Wie in I. nur die Fermentlösung vor Zugabe ½ Stunde bei 40° gestanden.

Tabelle XX.

	I. p_H 2,0 0 Minuten	II. p_H 2,0 30 Minuten	III. p_H 2,0 30 Minuten
Nephelometr. Ablesung	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0 20,0	37,9 37,9 38,3 38,3 38,3 38,3	35,8 34,9 35,5 34,8 35,6 34,9
Durchschnitt . .	20,0	38,2	35,1
Verglichen mit .	I = 20	I = 20	I = 20
Spaltung in Proz.	0	47,7	43,0

Versuch 21. Substrat: 12 ccm Albumin + 33,5 n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 138 ccm. p_H 1,66. Fermentlösung 1 : 32000 mit verdünnter HCl auf p_H 1,64. Auf 23 ccm Substratlösung 2 ccm Fermentlösung. I. Fermentzugabe sofort. — II. Nach ½stündigem Stehen bei 40°. — III. Nach zweistündigem Stehen bei 40°.

Tabelle XXI.

	I. p_H 1,64			II. p_H 1,67		III. p_H 1,69	
Zeit in Minuten	0	15	30	15	30	15	30
Nephelometr. Ablesung	20,0 20,0 20,0 20,0 20,0 20,0	29,6 29,1 29,5 29,2 29,6 29,1	30,1 30,8 30,2 30,7 30,1 30,8	28,0 27,9 28,2 28,1 28,2 28,0	28,7 29,8 28,8 29,8 28,8 29,8	26,5 26,4 26,5	27,7 27,7 27,6
Durchschnitt . . .	20	29,4	30,4	28,1	29,3	26,5	27,6
Verglichen mit . .	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20	Ia = 20
Spaltung in Proz. .	0	32,0	34,2	28,7	31,7	24,5	27,8

Versuch 22. Substrat: 12 ccm Albumin, 33 ccm n/10 HCl, destilliertes Wasser zu 138 ccm. p_H 1,72. Fermentlösung 1 : 34000 mit verdünnter HCl auf p_H 1,77 gebracht. Zu 23 ccm Substrat 2 ccm Ferment. — I. Fermentzugabe sofort. — II. Nach zweistündigem Stehen bei 40°.

Tabelle XXII.

	I. p_H 1,73						II. p_H 1,73					
Zeit in Minuten	0		15		30		0		15		30	
Nephelometr. Ablesung	20,0	20,0	27,2	26,7	30,0	—	20,0	19,8	23,6	24,0	25,1	24,4
	20,0	20,4	27,4	26,5	29,9	—	20,0	19,8	23,8	24,0	25,3	24,8
	20,0	20,2	27,2	26,7	30,0	—	20,0	19,8	23,7	24,0	25,1	24,9
Durchschnitt . .	20,2		26,9		30,0		19,9		23,9		25,0	
Verglichen mit .	II = 20		IIa = 20		II = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	0,1		25,7		33,3		0,5		16,2		20,0	

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei den bisher beschriebenen Versuchen (bei p_H 2,3 bis 2,4 und 40°) eine Schädigung des Ferments während des Versuchs durch die Acidität des Mediums nicht stattfand oder jedenfalls nur eine geringfügige war. Doch erklärt eine geringe Schädigung des Ferments das mitunter auftretende leichte Absinken der Reaktionskonstanten zu Ende der Spaltung. Dagegen ist die Schädigung des Ferments auf der sauren Seite vom Optimum durch die Acidität des Milieus sehr beträchtlich und bedingt hier den steilen Abfall der p_H-Wirkungskurve.

VI.

Im folgenden sollen einige Versuche mitgeteilt werden, die den Einfluß der Spaltprodukte auf den Gang der peptischen Spaltung prüfen. Zuerst wurde die etwaige Wirkung der durch peptische Verdauung gewonnenen Spaltprodukte untersucht. Zu diesem Zwecke wurden Substratlösungen doppelt so großer Konzentration, als wir sonst für unsere Fermentversuche benutzten, bei 40° so lange mit Pepsin verdaut, bis sie keine oder nur noch Spuren von Sulfosalicylsäurereaktion zeigten. Diese Lösung wurde aufgekocht, ihre Acidität festgestellt. In einem gewöhnlichen Spaltungsversuch wurden gleiche Volumina der Albuminlösung und der Lösung mit den Spaltprodukten vermischt, so daß — da die Lösung der Spaltprodukte aus einem Substrat doppelt so starker Konzentration hergestellt war, als im Spaltungsversuch selbst benutzt wurde — die Menge der zu dem Spaltungsversuch zugesetzten Spaltprodukte so viel betrug, wie aus der Spaltung überhaupt entstehen konnte, also 100 Proz. Der fermentative Vorgang wurde nun in diesem System mit einem System ohne Spaltprodukte unter sonst gleichen Bedingungen verglichen. Da die durch Säure gewonnenen Spaltprodukte anders wirken könnten als die (mit

Ferment beladenen?) peptischen Produkte, wurde auch ein durch sehr vorsichtige Säurehydrolyse (bei p_H 2,4) gewonnenes Spaltprodukt hergestellt, das nur noch Spuren von Sulfosalicylsäurereaktion zeigte. In diesem Versuch betrug die N-Menge der Spaltprodukte etwas über 35 Proz. des Albumin-N.

Versuch 23. (Tabelle XXIII.) 25 ccm der durch peptische Verdauung gewonnenen Spaltproduktlösung entsprechen 2 ccm der Albuminlösung (100 Proz. Spaltprodukte). p_H 2,33. I. 2 ccm Albuminlösung, 18 ccm n/214 HCl, 1,7 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 23,0 ccm. — II. 2 ccm

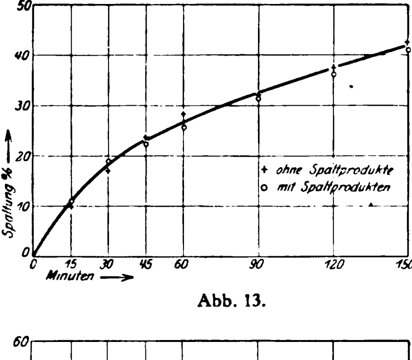


Abb. 13.

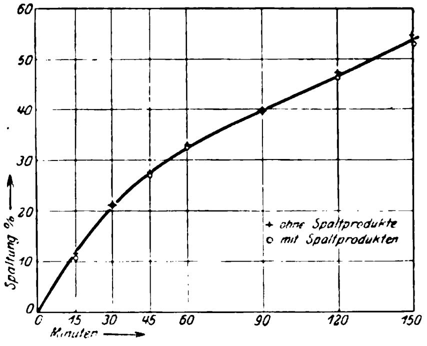


Abb. 14 (siehe Tabelle XXV).

Albuminlösung, 13 ccm n/214 HCl, 5 ccm Spaltprodukte, 1,7 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 23,0 ccm. — III. 2 ccm Albuminlösung, 18 ccm Spaltprodukte, 1,7 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 23,0 ccm. Je 2 ccm Fermentlösung (1 : 27000).

Versuch 24. (Tabelle XXIV.) I. 4 ccm Albumin, 7,6 ccm n/40 HCl, 25 ccm n/229 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. p_H 2,36. 4 ccm Fermentlösung (1 : 27000). — II. 4 ccm Albumin, 7,6 ccm n/40 HC 1,25 ccm peptische Spaltprodukte, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Fermentlösung (1 : 27000).

Versuch 25. (Tabelle XXV.) I. 4 ccm Albumin, 13,2 ccm n/40 HCl, 25 ccm n/148 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. p_H 2,05. 4 ccm Ferment (1: 38000). — II. 4 ccm Albumin, 13,2 ccm n/40 HCl, 25,0 ccm Spaltprodukte (durch Säurespaltung gewonnen), destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 38000).

	I. p_H 2,44						II. p_H 2,45						III. p_H 2,48					
Zeit in Minuten	0		15		30		0		15		30		0		15		30	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	27,5	28,2	34,0	34,0	20,0	20,0	28,0	28,2	34,0	34,1	20,0	20,0	27,9	27,5	34,2	34,3
	20,0	20,0	27,6	28,2	34,1	34,0	20,0	19,9	34,2	34,3	34,2	34,3	20,0	20,0	28,1	28,0	34,2	34,4
	20,0	20,0	27,5	28,4	34,1	34,0	20,0	19,8	34,2	34,2	34,2	34,2	20,0	20,0	28,2	28,0	34,0	34,3
Durchschnitt	20,0		27,9		34,0		20,0		28,2		34,2		20		27,9		34,2	
Verglichen mit	I = 20						I = 20						I = 20					
Spaltung in Proz.	0		28,4		41,2		0		29,0		41,5		0		28,4		41,5	
Proz.-Gehalt an Spaltprodukten	0						20						72					

Tabelle XXIV (Abb. 13).

	I. p_H 2,31															
Zeit in Minuten	0		15		30		45		60		90		120		150	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	22,6	22,6	25,5	25,0	27,5	27,8	30,1	29,5	33,2	33,4	38,1	38,7	33,3	33,5
	20,0	20,0	22,7	22,7	25,7	25,0	27,7	27,9	30,2	29,5	33,1	33,6	38,2	38,6	33,2	33,4
	20,0	20,0	22,6	22,6	25,5	25,2	27,5	27,8	30,2	29,5	33,2	33,5	38,1	38,7	33,2	33,5
Durchschnitt	20,0		22,6		25,3		27,6		29,9		33,3		38,4		33,3	
Verglichen mit	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20	
Spaltung in Proz.	0		11,5		21,0		27,5		33,1		39,8		47,4		54,9	

	II. p_H 2,32															
Zeit in Minuten	0		15		30		45		60		90		120		150	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	22,7	22,0	25,7	24,9	27,3	27,7	—	29,7	33,1	33,7	37,5	37,4	—	32,2
	20,0	20,0	22,8	22,0	25,4	25,2	27,0	27,7	—	29,6	33,2	33,5	37,7	37,5	—	32,2
	20,0	20,0	22,8	22,0	25,7	25,1	27,1	27,7	—	29,7	33,1	33,7	37,4	37,4	—	32,2
Durchschnitt	20,0		22,4		25,4		27,4		29,7		33,4		37,5		32,2	
Verglichen mit	Ia = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	0		10,4		21,2		26,9		32,6		40,1		46,6		52,9	

Tabelle XXV (Abb. 14).

I. p_H 2,05																
Zeit in Minuten	0		15		30		45		60		90		120		150	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	22,2	22,1	24,2	24,1	25,9	26,6	27,9	—	30,1	28,9	31,9	31,9	35,1	34,7
	20,0	20,0	22,0	22,2	24,3	24,0	25,8	25,8	28,1	—	30,0	28,8	32,0	32,0	35,1	34,7
	20,0	20,0	22,3	22,1	24,2	24,1	25,9	25,9	28,0	—	30,1	28,9	31,9	32,0	35,1	34,8
Durchschnitt	20,0		22,2		24,2		25,9		28,0		29,5		32,0		34,9	
Verglichen mit	Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20		Ia = 20	
Spaltung in Proz.	0		9,9		17,3		23,7		28,6		32,2		37,4		42,7	

II. p_H 2,05																
Zeit in Minuten	0		15		30		45		60		90		120		150	
Nephelometrische Ablesung	20,0	20,0	—	22,4	24,8	—	26,0	25,3	27,3	27,2	29,5	29,5	31,4	31,3	34,4	33,1
	20,0	20,0	—	22,6	24,6	—	25,8	25,4	27,4	27,0	29,4	29,4	31,6	31,2	35,0	33,2
	20,0	20,0	—	22,5	24,7	—	25,8	25,3	27,4	27,2	29,5	29,5	31,5	31,3	34,9	33,1
Durchschnitt	20,0		22,5		24,7		25,6		27,3		29,5		31,4		34,0	
Verglichen mit	Ia = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20		IIa = 20	
Spaltung in Proz.	0		11,0		18,9		21,8		25,3		32,2		36,2		41,2	

Diese Versuche zeigen, daß Spaltprodukte, die durch peptische Verdauung gewonnen wurden, wie auch solche, die durch Säurehydrolyse erhalten wurden, unter den gegebenen Bedingungen den Vorgang der peptischen Spaltung in keiner Weise zu beeinflussen vermochten. Diese Frage wird noch weiter verfolgt werden.

VII.

Die Beziehungen der Reaktionsgeschwindigkeit der peptischen Spaltung zur Temperatur sind in den folgenden Versuchen dargestellt. Auch hier, wie in den übrigen Abschnitten, sind nur einige aus einer größeren Zahl Versuche mit gleichen Ergebnissen mitgeteilt. Verglichen wurde die fermentative Spaltung bei 30 und bei 40°. Die Schwankungen der Temperatur während der Versuche überstiegen nicht ± 0,05°.

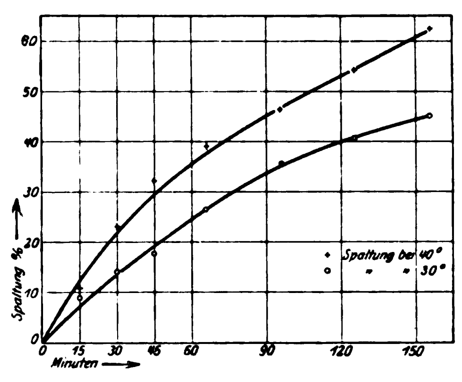


Abb. 15.

Versuch 26. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,36. Temperatur 40°. — II. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,38. Temperatur 30°.

Tabelle XXVI (Abb. 15).

Spaltungs-zeit Minuten	I. 40°. p_H 2,36			II. 30°. p_H 2,38		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{a}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$
15	12,5	87,5	9,40	7,5	92,5	4,43
30	23,3	26,7	10,25	14,2	85,8	5,58
45	31,0	69,0	10,00	19,5	80,5	5,38
65	39,3	60,7	9,75	26,4	73,6	5,50
95	49,5	50,5	10,30	35,3	64,7	5,72
125	56,5	43,5	10,40	40,5	59,5	5,44
150	62,8	37,2	11,22	44,8	55,2	5,42
Im Durchschnitt . . .			10,19	—	—	5,35

$K_{t_{40}} : K_{t_{30}} = 1,90$.

Versuch 27. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,36. Temperatur 40°. — II. Wie in I. p_H 2,37. Temperatur 30°.

Tabelle XXVII (Abb. 16).

Spaltungszeit Minuten	I. 40°. p_H 2,36			II. 30°. p_H 2,37		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{a}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$
15	10,2	89,8	7,57	5,0	95,0	3,51
30	17,6	82,4	7,15	9,8	90,2	3,62
45	24,5	75,5	7,23	14,0	86,0	3,62
60	29,5	70,5	7,00	18,3	81,7	3,74
90	38,0	62,0	6,82	25,9	74,7	3,88
120	46,0	54,0	7,12	32,5	67,5	4,03
150	51,4	48,6	7,06	38,0	62,0	4,08
Im Durchschnitt . . .			7,13	—	—	3,78

$K_{t_{40}} : K_{t_{30}} = 1,9.$

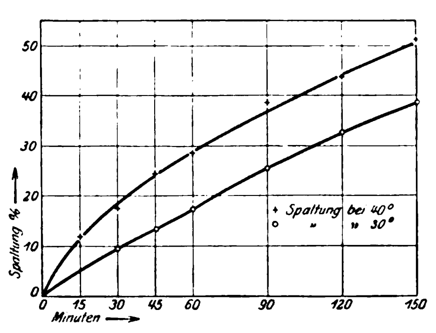


Abb. 16.

Versuch 28. I. 4 ccm Albumin, 11 ccm n/40 HCl, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Ferment (1 : 28000). p_H 2,38. Temperatur 40°. — II. Wie in I. p_H 2,40. Temperatur 30°.

Tabelle XXVIII (Abb. 17).

Spaltungszeit Minuten	I. 40°. p_H 2,38			II. 30°. p_H 2,50		
	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$	x	$a-x$	$\frac{1}{t}\frac{x}{(a-x)\,a}=k\cdot10^5$
20	20,5	79,5	12,78	11,5	88,5	6,75
40	32,5	67,5	12,02	21,0	79,0	6,64
60	40,3	59,7	11,25	26,7	73,3	6,08
80	48,2	51,8	11,62	34,0	66,0	6,44
100	55,5	44,5	12,45	38,8	61,2	6,34
120	61,1	38,9	13,05	42,7	57,3	6,22
150	—	—	—	48,0	52,0	6,15
Im Durchschnitt . . .			12,21	—	—	6,37

$K_{t_{40}} : K_{t_{30}} = 1,9.$

Der Temperaturkoeffizient der peptischen Spaltung beträgt demnach im Temperaturintervall 30 bis 40° — in guter Übereinstimmung mit den Angaben von *Sv. Arrhenius* und von *R. O. Herzog*[1]) — 1,9.

Zusammenfassung.

1. Die mit der nephelometrischen Methode (mit dem Nephelometer von *Schmidt* und *Haensch*) ausgeführte Untersuchung über die peptische Spaltung vom Serumalbumin ergab, daß der Verlauf des fermentativen Vorgangs sich befriedigend durch die Formel der bimolekularen Reaktion darstellen läßt.

2. Da die so gewonnenen Reaktionskonstanten sich umgekehrt proportional der Substratkonzentration, direkt proportional der

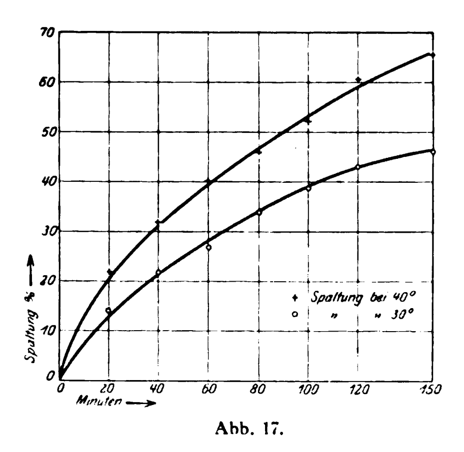


Abb. 17.

Fermentkonzentration verhalten, so ändern sich die Konstanten bei Änderung beider Konzentrationen im gleichen Verhältnis nicht. Kennt man den Verlauf bei einer Substrat- und Fermentkonzentration, so läßt sich demnach — innerhalb der untersuchten Grenzen — der Umsatz für andere Substrat- und Fermentkonzentrationen berechnen.

3. Auch bei nicht optimaler $H^{\cdot}$-Konzentration, und zwar auf der alkalischen Seite, läßt sich der Verlauf der Spaltung durch die bimolekulare Reaktion gut darstellen, während auf der sauren Seite die so berechneten Reaktionskonstanten stark abfallen. Der Grund hierfür ist die beträchtliche Schädigung des Ferments durch die hohe Acidität (von p_H etwa 1,7) des Mediums, die auch den steilen Abfall der p_H-Wirkungskurve

---

[1]) Zitiert nach *Oppenheimer-Kuhn*, Die Fermente, 5. Aufl., S. 153. Über den Temperaturkoeffizienten und die Temperaturinaktivierung des Pepsins vgl. auch die nach Abschluß dieser Untersuchung erschienene Arbeit von *R. Ege*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **143**, 159, 1925.

hier verursacht, während noch bei 2,3 bis 2,4 (bei 40°) während der Versuchszeit keine oder nur eine geringfügige Schädigung des Ferments zu beobachten war. Zwischen $[H^{\cdot}] = 4{,}17 \cdot 10^{-3}$ und $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ ist die Geschwindigkeit der Spaltung in großer Annäherung der $H^{\cdot}$-Konzentration direkt proportional.

4. Einen Einfluß der Spaltprodukte — der fermentativ sowohl als der durch Säurehydrolyse gewonnenen — auf den Verlauf der Spaltung konnte man unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht beobachten.

5. Der Temperaturkoeffizient der peptischen Spaltung betrug 1,9. (Im Temperaturintervall 30 bis 40°.)

Vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft durchgeführt.

Bei der Ausführung der Versuche hat uns Frl. *Otte* wertvolle Hilfe geleistet.

Über die partielle Hydrolyse der Rohrzucker-phosphorsäure zu d-Fructose und d-Glucose-phosphorsäure [1]).

Von

J. Hatano (Tokyo).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 30. März 1925.)

Bei Versuchen über die wichtige Fermentgruppe der Phosphatasen haben mit Erfolg oft die Salze der Saccharo-phosphorsäure als Substrat Anwendung gefunden. Die Verbindungen der Rohrzucker-phosphorsäure werden synthetisch aus Saccharose und Phosphoroxychlorid nach einem von *C. Neuberg* und *H. Pollak* angegebenen Verfahren[2]) dargestellt. Sowohl die Alkali- als die Erdalkalisalze der Rohrzucker-phosphorsäure sind in Wasser löslich und daher für Aufgaben der Enzymchemie besonders geeignet.

Die Rohrzucker-phosphorsäure enthält 1 Mol. Phosphorsäure auf die Elemente des Disaccharids. Die Metallsalze der genannten Säure sind amorph. In kristallisiertem Zustande ist bisher nur das Strychninsalz[3]) bekannt geworden. Es steht nicht fest, an welchem der beiden Hexosenreste, die zum Rohrzucker vereinigt sind, die Phosphorsäure haftet. Eine Entscheidung darüber habe ich auf Vorschlag von *C. Neuberg* durch partielle Hydrolyse des Saccharophosphats herbeigeführt. Diese wurde so geleitet, daß die disaccharidische Ätherbrücke gesprengt wurde, während die estermäßige Verknüpfung von Hexoseradikal und Phosphorsäure unversehrt blieb.

Durch die Einfügung der Phosphorsäure ist, wie man annehmen darf, die typische Rohrzuckerstruktur nicht alteriert, und so ist es in der Tat möglich, die erfahrungsgemäß leicht zu bewerkstelligende Invertierung des Rohrzuckers auch bei der Rohrzucker-phosphorsäure vorzunehmen, ohne daß zugleich die Phosphorsäure abgespalten wird.

Beim Erwärmen mit verdünnten Säuren erlangt eine Lösung von Rohrzucker-phosphorsäure schnell Reduktionsvermögen, und wenn man die Einwirkung der Säure in dem Zeitpunkt unterbricht, zu dem von der in Esterform vorhandenen Phosphorsäure gerade die ersten

[1]) Zur Ausführung dieser Arbeit standen Mittel der Hajime Hoshi-Stiftung zur Verfügung, für die besonders gedankt sei.

[2]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **23**, 515, 1910; **26**, 521, 1910.

[3]) *C. Neuberg* und *O. Dalmer*, ebendaselbst **131**, 188, 1922.

Spuren als anorganisches Phosphat frei werden, so ist die erstrebte *partielle Hydrolyse der Saccharo-phosphorsäure* erzielt. Es hat eine *Zerlegung in d-Fruktose einerseits und d-Glucose-phosphorsäure andererseits* stattgefunden. Im einzelnen verfährt man folgendermaßen.

Als zweckmäßiges Ausgangsmaterial dient das *rohrzucker-phosphorsaure Calcium*. Man löst dieses in Wasser, indem man das pulverförmige Salz in heißes Wasser einträgt, aber nicht umgekehrt; beim Zusatz von Wasser zu festem Salz bildet sich nämlich leicht eine an den Glaswandungen haftende zähe Masse, die dann nur langsam in Lösung geht. Fügt man nun zu der Lösung des rohrzucker-phosphorsauren Calciums in der Wärme einen Überschuß von wässeriger Oxalsäure, so scheidet sich das Calciumoxalat in gut zu filtrierender Gestalt ab. Die klar filtrierte Flüssigkeit gewinnt bei weiterem Erwärmen auf dem Wasserbade schnell die Fähigkeit, *Fehling*sche Mischung zu reduzieren, zeigt zunächst jedoch bei der Probe mit Ammoniak und Magnesiamixtur in der Kälte keinen Gehalt an Phosphat-ionen. Nach ungefähr halbstündigem Erhitzen tritt die erste Reaktion abgespaltener Phosphorsäure mit Magnesiamischung ein. Nach zahlreichen Versuchen hat es sich als günstig erwiesen, jetzt noch 2 Minuten zu erwärmen; dabei nimmt man eine unbedeutende Zersetzung der abgespaltenen Glucosephosphorsäure in Kauf, erreicht aber vollständige Aufhebung der Rohrzuckerbindungen. Man neutralisiert nunmehr mit gefälltem kohlensauren Kalk und läßt abkühlen. Nach dem Erkalten fügt man Kalkwasser bis zur deutlichen Rötung von Phenolphthalein hinzu, entfernt einen Kalküberschuß durch sofortiges Einleiten von Kohlendioxyd und filtriert.

Das klare Filtrat wird im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Badtemperatur eingeengt, wobei zumeist eine Trübung erfolgt, herrührend von kleinen Mengen kohlensauren sowie phosphorsauren Calciums; ersteres stammt aus gelöstem Calciumbicarbonat, letzteres aus abgespaltenem Calciumphosphat. Die wiederum filtrierte Flüssigkeit läßt man alsdann unter ständigem Umrühren in dünnem Strahl in etwa das vierfache Volumen absoluten Alkohols einfließen. Dabei fällt sofort das *Calciumsalz der Glucose-mono-phosphorsäure* aus, während in der alkoholischen Lösung der abgespaltene Fruchtzucker zugegen ist.

Nach einigem Stehen wird das abgeschiedene Calcium-glucosephosphat abgesaugt. Man reinigt es durch Wiederaufnahme in Wasser, Filtration und erneute Ausfällung mittels Alkohol.

Leichter rein als das Calciumsalz ist das *Bariumsalz der Glucosephosphorsäure* bei dem beschriebenen Abbau der Rohrzucker-monophosphorsäure zu gewinnen. Am bequemsten geht man wiederum vom Calciumsalz der Rohrzucker-phosphorsäure aus, auf das man

Oxalsäure in der angegebenen Weise einwirken läßt. Die vom Calciumoxalat abfiltrierte und auf dem Wasserbade bis zum ersten Auftreten von Phosphat-ionen erwärmte Flüssigkeit wird jetzt mit Bariumcarbonat und schließlich mit Barytwasser neutralisiert. Die Behandlung mit Kohlensäure, die Konzentrierung, die Abscheidung durch Alkohol sowie die Umfällung geschieht genau wie bei dem Calciumsalz.

In der alkoholischen Lösung, aus der das Calcium- bzw. Bariumsalz der Glucose-mono-phosphorsäure niedergeschlagen ist, befindet sich, wie erwähnt, die *d-Fructose*. Sie ist nach dem Verdampfen des Weingeistes durch ihre Linksdrehung, ihre sofortige Vergärung mittels Hefe sowie durch ihr charakteristisches Methyl-phenyl-osazon, das ich nach der Vorschrift von *Neuberg*[1]) bereitet habe und das leicht kristallisiert, ohne weiteres nachzuweisen.

Für die Glucose-phosphorsäure, die auf die angegebene Art gewonnen wird und noch nach verschiedenen Richtungen hin untersucht werden muß, möchte ich anführen, daß sie mit gärtüchtiger Unterhefe in Gärung gerät, wenn auch langsam. Offenbar tritt zunächst eine *Phosphatase* in Funktion, und dann fällt der in Freiheit gesetzte Zucker der alkoholischen Zuckerspaltung anheim. Die Glucose-phosphorsäure verhält sich also hierbei ebenso[2]) wie ihre Muttersubstanz, die Rohrzucker-phosphorsäure; daß die Phosphorisierung Fermentreaktionen auch unterbinden kann, haben *B. Helferich, A. Loewa, W. Nippe* und *H. Riedel*[3]) am Beispiel der Phosphorsäureester einiger Glucoside und Disaccharide gezeigt, wobei jedoch die Derivate der Gentiobiose- und Maltosegruppe eine Ausnahme machen. Es liegen übrigens auch Anzeichen dafür vor, daß auf enzymatischem Wege, durch Invertase, die Rohrzucker-phosphorsäure in Glucose-phosphorsäure und Fructose zerlegt werden kann, worüber noch zu berichten ist. —

10 g rohrzucker-phosphorsaures Calcium wurden in 200 ccm Wasser gelöst und mit 3 g Oxalsäure in 150 ccm Wasser versetzt. Nunmehr wurde auf dem Wasserbade 5 Minuten erwärmt und darauf klar filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade 30 Minuten erhitzt. Nach Zugabe von Magnesiamischung war dann die erste Trübung wahrzunehmen.

Die Lösung wurde zunächst mit $CaCO_3$ und nach Abkühlung mit $Ca(OH)_2$ neutralisiert. Wenn die Flüssigkeit schwach alkalisch geworden ist, muß man sofort Kohlendioxyd einleiten, bis rotes Lackmuspapier nicht mehr gebläut wird.

Der Niederschlag von kohlensaurem Kalk wurde abfiltriert und nachgewaschen. Die klare Lösung wurde im Vakuum bis auf ungefähr

[1]) *C. Neuberg*, Ber. **35**, 960, 1902.
[2]) *K. Djenab* und *C. Neuberg*, ebendaselbst **82**, 391, 1917.
[3]) *B. Helferich, A. Löwa, W. Nippe* und *H. Riedel*, H. **128**, 141, 1923.

25 ccm abgedampft. Nach Beseitigung der aufgetretenen Trübungen und Nachwaschen ließ ich die Lösung in reinen Alkohol langsam einfließen. Die Fällung wurde nach 24 Stunden abgesaugt und mit Alkohol nachgewaschen. Der Niederschlag wurde nochmals in warmem Wasser aufgenommen und die Flüssigkeit mit wenig Tierkohle stark geschüttelt, klar filtriert und in reinen Alkohol eingetropft. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Alkohol gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Ausbeute belief sich auf 5,8 g.

Ungefähr 2 g Substanz wurden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur 2 Wochen lang getrocknet; dabei verlor die Verbindung rund 10 Proz. Wasser. Die so vorbereitete Substanz lieferte beim Glühen reines Calciumpyrophosphat. Aus dessen Menge berechnet sich, daß die Substanz noch 6,18 Proz. H_2O enthielt. Diese Zahl stimmt ganz gut auf die Formel: $C_6H_{11}O_6 . PO_3Ca + 1 H_2O$, welche 5,70 Proz. H_2O anzeigt. Allein der sichere Beweis für diese Zusammensetzung ließ sich nicht erbringen. Deshalb habe ich meine Analysen auf reine Trockensubstanz berechnet, d. h. unter Berücksichtigung der tatsächlich gefundenen 6,19 Proz. H_2O.

0,1743 g Trockensubstanz ergeben 0,0782 g $CaSO_4$;
0,1865 g „ „ 0,0668 g $Mg_2P_2O_7$.

$C_6H_{11}O_6 . PO_3Ca$. Ber.: Ca = 13,42; P = 10,40 Proz.
(298) Gef.: Ca = 13,19; P = 9,98 „ .

Das Calciumsalz ist in Wasser klar löslich. Es reduziert heiße *Fehling*sche Mischnug, wobei anorganische Phosphorsäure abgespalten wird. Das mit verdünnter Salpetersäure bis zur Auflösung des Kupferoxyduls versetzte Gemenge gibt mit Ammoniumnitrat enthaltendem Ammoniummolybdat sofort eine dicke gelbe Fällung. Auch durch Abdampfen mit Königswasser oder Erwärmen mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz[1]) kann man Phosphorsäure in Freiheit setzen.

Das mehrfach umgefällte Salz zeigt keine Reaktion nach *Seliwanoff* auf Fruchtzucker; die bei den ersten Versuchen[2]) zur partiellen Hydrolyse des Saccharophosphats erhaltene Substanz schloß anscheinend noch Spuren des Ausgangsmaterials ein, da wegen beginnender Karamelisierung die Einwirkung der damals benutzten Salzsäure nach 15 Minuten schon unterbrochen werden mußte. Es ist jedoch auch damit zu rechnen, daß das Calciumsalz der Rohrzucker-phosphorsäure nicht einheitlich, d. h. ein Gemisch von verschiedenen Monophosphorsäureestern des Rohrzuckers, ist.

Von der Glucose-mono-phosphorsäure sind schließlich auch kristallisierte Derivate im hiesigen Institut erhalten. Hierüber wie über die mutmaßliche Konfiguration der Verbindung wird demnächst Mitteilung gemacht werden.

[1]) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 196, 1915.
[2]) *C. Neuberg* und *E. Kretschmer*, ebendaselbst **36**, 13, 1911.

Beiträge zur Biochemie der Avitaminosen.

Von

Alexander Palladin.

Nr. 6.

Über den Einfluß der Maisnahrung auf die Stickstoff-, Kreatinin- und Kreatinausscheidung bei Kaninchen und auf die Gewichtskurve der Meerschweinchen.

(Zur Biochemie der Pellagra.)

Von

Alexander Palladin und **Katharina Kratinowa.**

(Aus der Forschungsanstalt für Biochemie zu Charkow.)

(Eingegangen am 31. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Da die Maisnahrung in Verbindung gebracht wird mit der *Pellagraerkrankung*, so war in den letzten 20 Jahren die Frage nach dem Nährwert des Maises mehr als einmal der Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Obwohl bekanntlich die Pellagra auch beim Fehlen von Mais in der Nahrung entstehen kann, so beginnen doch praktisch die Pellagraerkrankungen gewöhnlich erst mit der Einführung der Maiskultur in der betreffenden Gegend und mit dem Übergang der Bevölkerung zu einer Nahrung, die vorzugsweise aus diesem Produkt besteht, und umgekehrt, die Krankheit verschwindet mit der Einschränkung des Maisgenusses.

So wurde in Ägypten im Jahre 1840 mit der Anpflanzung des Maises begonnen, und im Jahre 1847 traten die ersten Fälle von Pellagra auf. In Spanien begann die Pellagra gleichfalls mit der Einführung der Maiskultur und war dort im Laufe von zwei Jahrhunderten eine gewöhnliche Erscheinung. Jetzt aber, wo die Anbaufläche des Maises verkleinert und diejenige des Roggens, Weizens und Hafers vergrößert wurde, ist die Pellagra fast gänzlich verschwunden.

Trotz dieser augenscheinlichen Beziehung zwischen der Maisnahrung und der Pellagra ist die Frage nach der Ätiologie der Pellagra, nach der Entstehungsursache jener pathologischen Veränderungen im Leben des Organismus, die für die Pellagra charakteristisch sind, bis auf den heutigen Tag noch nicht endgültig gelöst. Ob nun bei der Entstehung der Pellagra

das Fehlen der Vitamine im Mais die Hauptrolle spielt, ober ob die Ursache in einer Minderwertigkeit seiner Eiweiße zu suchen ist, oder endlich, ob das Verhältnis zwischen den Eiweißen und der im Mais reichlich enthaltenen Stärke kein für den Organismus zweckmäßiges ist, darüber gehen die Meinungen auseinander.

Es gibt ziemlich viele Untersuchungen, deren Zweck es war, die Zusammensetzung des Maises, seinen Gehalt an Vitaminen sowie den biologischen Wert seiner Eiweiße festzustellen, ebenso gibt es eine Reihe von Versuchen, die Pellagra bei Tieren experimentell zu erzeugen und auf diese Weise den Einfluß des Maises auf den tierischen Organismus aufzuklären.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß der Mais (ganze Körner) arm an *A-Vitaminen* ist [*Hogan*[1]), *Mc Collum*, *Simmonds* und *Pitz*[2])]. Die *B-Vitamine* sind im Mais in vollständig genügender Menge enthalten (*Mc Collum*, *Simmonds* und *Pitz*), wobei entsprechend den Untersuchungen von *Chicke* und *Hume*[3]), *Voegtlin*, *Lake* und *Meyers*[4]) die B-Vitamine vorzugsweise in dem Keimteil des Kornes, sowie im Perikarp enthalten sind. Nach *Voegtlin* und *Meyers* können die Maiskörner ohne den Keimling dem tierischen Organismus die für ihn notwendigen Mengen an B-Vitaminen nicht liefern. Die C-Vitamine fehlen nach den Untersuchungen von *Hölst* und *Fröhlich*[5]) im Mais fast vollständig.

Was wissen wir nun betreffs der in den Maiskörnern enthaltenen Eiweißsubstanzen? Die verschiedenen Eiweißsubstanzen haben, wie die Untersuchungen von *Röhmann*, *Willcook* und *Hopkins*, *Osborne* und *Mendel*[6]) gezeigt haben, je nach ihrem Gehalt an Aminosäuren einen verschiedenen biologischen Wert; die einen von ihnen sind *vollwertig* und können den Bedarf des tierischen Organismus an Eiweißsubstanzen (an allen ihm notwendigen Aminosäuren) vollständig decken; andere dagegen sind *minderwertig*: sie enthalten entweder gar nicht oder nur in zu geringen Mengen einige der für den tierischen Organismus notwendigen Aminosäuren, die er auf dem Wege der Synthese nicht bilden kann. Die Eiweißsubstanzen des Maises bestehen aus [*Jons*, *Finks* und *Paul*[7])]:

Globulin und Albumin	21,3 Proz.
Zein	41,4 „
Glutenin	30,8 „
in Alkohol Unlöslichem	5,9 „

Von diesen Eiweißen stellt das Glutenin ein biologisch vollwertiges Eiweiß dar, während das Zein nach den Untersuchungen von *Willcook* und *Hopkins*, *Henriques*, *Osborne* und *Mendel* ein *minderwertiges* ist; nun aber entfallen auf das Zein 41,4 Proz. sämtlicher Maiseiweiße. Infolgedessen halten *Osborne* und *Mendel* die Maiseiweiße überhaupt für minderwertig;

---

1) *Hogan*, Journ. of biol. Chem. **27**, 193, 1916.
2) *Mc Collum*, *Simmonds* and *Pitz*, ebendaselbst **28**, 153, 1916.
3) *Chicke* und *Hume*, Proc. Roy. Soc., B. **90**, 44, 1917.
4) *Voegtlin*, *Lake* und *Meyers*, Amer. Journ. of Physiol. **48**, 504, 1919.
5) *Hölst* und *Fröhlich*, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. **72**, 1, 1912.
6) *Osborne* und *Mendel*, Journ. Biol. Chem. **14**, 31, 1913.
7) *Jons*, *Finks* und *Paul*, ebendaselbst **41**, 191, 1920.

in Übereinstimmung hiermit fand *Hogan*, daß die Maisfütterung der Schweine ihren Bedarf an Eiweißsubstanzen nicht befriedigen kann. *Mc Collum* und *Simmonds*[1]) halten gleichfalls die Maiseiweiße für minderwertig: nach ihrer Ansicht enthält der Mais sämtliche notwendigen Aminosäuren, jedoch nicht in der nötigen Proportion. Andererseits glaubt *Funk*[2]), der sich auf die Versuchsresultate von *Weil* und *Mauriquand*[3]), *Huques*, *Voegtlin*, *Lake* und *Meyers* stützt, bei deren Versuchen Vögel, die mit Mais gefüttert worden waren, sich vollständig normal fühlten[4]), den Mais in bezug auf seine Eiweißsubstanzen nicht als ein minderwertiges Produkt ansehen zu können.

Da im Mais einige Vitamine fehlen, so konnte man erwarten, daß die Maisnahrung bei Tieren irgend eine von den uns bekannten *Avitaminosen*, d. h. eine der durch das Fehlen von Vitaminen in der Nahrung bedingten Krankheiten hervorrufen wird. *Schaumann*, der Kaninchen mit Mais fütterte, beobachtete bei ihnen Beriberi; aber *Funk* bemerkt mit Recht, daß, da der Mais reich am B-Vitamin ist, dies nicht Beriberi, sondern wahrscheinlich Skorbut war. Nach *Bezzola*[5]) ruft die Maisnahrung bei Meerschweinchen Haarausfall, Verlust des Appetits, Verdauungsstörungen und Tod hervor. Dies wurde von *Lucksch*[6]) bestätigt, der gefunden hatte, daß auch Kaninchen die Maisnahrung nicht vertragen. *Hölst* fand, daß Mais, da er des C-Faktors entbehrt, bei Meerschweinchen Skorbut hervorruft, und sieht als Skorbut diejenigen Erscheinungen an, die *Bezzola* und andere beobachtet haben. *Rondony* ist gleichfalls der Ansicht, daß die Maisnahrung bei Meerschweinchen Skorbut, aber keine Pellagra hervorruft.

Bei diesen Untersuchungen wurde die Minderwertigkeit des Maiszeins nicht berücksichtigt, so daß wir nicht sagen können, inwiefern die beobachteten Störungen durch das Fehlen des C-Faktors oder durch die Armut am A-Faktor bedingt waren und eine reine Avitaminose darstellten, und inwieweit für die Entwicklung derselben die Eiweißsubstanzen des Maises verantwortlich zu machen sind.

Gegenwärtig gibt es eine Reihe von Untersuchungen [*A. Palladin*[7]), *A. Palladin* und *Kudrjawzewa*[8]), *Bickel*[9]), *Collazo*[10]), *Kudrjawzewa*[11]), *Alpern* u. a.], in denen der Einfluß der einen oder anderen Avitaminoseform auf die Stoffwechselprozesse studiert wurde. Durch diese Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Fütterung der Tiere mit vitaminfreier Nahrung stets an bestimmten Teilen der Stoffwechselprozesse (hauptsächlich an Kohlehydrat- und endogenen Stickstoff-Kreatin-

---

[1]) *Mc Collum* und *Simmonds*, Journ. of biol. Chem. **32**, 29, 1917.
[2]) *C. Funk*, Die Vitamine. 1924.
[3]) *Weil* und *Mauriquand*, C. r. Soc. Biol. **80**, 372, 1917.
[4]) Woraus diese Autoren folgern, daß der Mais eine für Vögel vollständig hinreichende Menge vollwertiger Eiweiße enthält.
[5]) *Bezzola*, Zeitschr. f. Hygiene **56**, 75, 1907.
[6]) *Lucksch*, ebendaselbst 58, 474, 1908.
[7]) *Alexander Palladin*, diese Zeitschr. **152**, 228, 1924.
[8]) *A. Palladin* und *A. Kudrjawzewa*, ebendaselbst **152**, 373, 1924.
[9]) *Bickel*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 4.
[10]) *Collazo*, diese Zeitschr. **134**, 1922.
[11]) *Kudrjawzewa*, ebendaselbst **154**, 104, 1924.

stoffwechsel) in bestimmter Weise sich kundgibt. Wir hielten es deshalb für notwendig, den Einfluß des Maises auf die Stoffwechselprozesse zu studieren und, falls irgendwelche Störung in denselben eintreten würde, sie mit denjenigen, die für andere Avitaminosen festgestellt sind, zu vergleichen. Die vorliegenden Untersuchungen hatten denn auch den Zweck, den Einfluß der Maisnahrung auf die Prozesse des Stickstoff- bzw. Kreatinstoffwechsels klarzustellen.

I. Versuche über den Stoffwechsel bei Kaninchen.

Als Versuchstiere dienten erwachsene Kaninchen, deren Nahrung in der Vorversuchsperiode aus Hafer und Rüben bestand. Während der ganzen Versuchszeit befanden sich die Kaninchen in speziellen Käfigen, die für die Sammlung des Harns und der Fäzes bei Stoffwechselversuchen dienen. Diese Käfige waren so eingerichtet, daß die Kaninchen keine Möglichkeit hatten, ihre Fäzes zu fressen, was bei Arbeiten mit vitaminfreier Nahrung eine notwendige Bedingung ist, da ja in den Fäzes Vitamine enthalten sind (*Abderhalden*, *Portier* und *Randoin*). Der Harn wurde jeden zweiten Tag gesammelt, so daß die in den Tabellen angeführten Zahlen den Gehalt der einen oder anderen Substanzen im 48stündigen Harn (d. h. die Mengen der im Laufe von 48 Stunden ausgeschiedenen Substanzen) angeben.

Im Harn wurde der Gehalt an Gesamtstickstoff nach der Methode von *Folin-Farmer-Gulick* und an Kreatinin und Kreatin nach der Methode von *Folin* und *Morris* bestimmt. Nach dem Tode der Tiere wurde in ihren Muskeln der Kreatingehalt nach der von *Riesser* angegebenen und von *A. Palladin*[1]) modifizierten Methode bestimmt.

Um den Einfluß des Maises auf den Kreatinstoffwechsel aufzuklären, bekamen die Kaninchen als Nahrung gewöhnlichen Mais (ganze, trockene Körner). Die Versuche zeigten vor allem, daß der Mais, in Übereinstimmung mit den Angaben von *Schaumann*, keine Nahrung darstellt, die sämtliche Bedürfnisse des tierischen (Kaninchen-) Organismus an Nahrungssubstanzen befriedigen könnte, und die Kaninchen gingen nach längerer oder kürzerer Zeit (im Durchschnitt nach 50 bis 70 Tagen) ein. Ferner hat die Maisnahrung einen schlechten Einfluß auf den Appetit der Kaninchen; sie fressen nur wenig Mais und ungern; durchschnittlich fressen sie im Laufe des Tages nur 20 bis 40 g Mais auf.

Das Gewicht der Kaninchen nimmt bei der Maisnahrung ununterbrochen ab, und zwar zunächst langsam, dann schneller, so daß sie zu der Zeit, wo der Tod eintritt, bis zu 50 Proz. ihres Anfangsgewichts verloren haben.

---

[1]) *A. Palladin* und *A. Kudrjawzewa*, diese Zeitschr. **133**, 1922.

Was die Ausscheidung des Gesamtstickstoffs, Kreatinins und Kreatins anbelangt, so nimmt, wie aus Tabelle I, in der das Protokoll eines solcher Versuche angeführt ist, zu ersehen ist, die Ausscheidung des Gesamtstickstoffs zunächst leicht zu (während sie in der Norm im Laufe von 24 Stunden durchschnittlich 0,847 g ausmacht, beträgt sie in den ersten 10 Tagen der Maisnahrung für dieselbe Zeit durchschnittlich 0,864 g), dann ab und hält sich während der ganzen übrigen Periode fast auf gleicher Höhe (etwa 0,620 bis 0,670 g pro 24 Stunden), um in den letzten 2 bis 4 Tagen vor dem Tode einen starken Anstieg aufzuweisen. Bei der Umrechnung der gesamten ausgeschiedenen Stickstoffmengen auf Kilogramm Körpergewicht der Kaninchen erhält man ein solches Bild, daß im allgemeinen während der ganzen Zeit der Maisnahrung (mit Ausnahme der letzten 2 bis 4 Tage) pro Kilo Körpergewicht dieselbe Stickstoffmenge ausgeschieden wird, die ungefähr derjenigen gleich ist, wie sie auch in der Norm ausgeschieden wird.

Der Kreatinin- und Kreatinstoffwechsel ist bei der Maisnahrung in bedeutend höherem Maße gestört. Vor allem ist das *Auftreten von Kreatin im Harn* zu betonen, das normalerweise im Harn nicht enthalten ist und einige Tage (6 bis 8) nach Beginn der Maisperiode auftritt. Die Menge des ausgeschiedenen Kreatins nimmt zunächst (bis Ende der vierten Woche) zu, beginnt dann langsam abzunehmen, um in den letzten 4 Tagen vor dem Tode einen Anstieg zu geben.

Die Kreatininausscheidung bleibt mit dem Übergang zur Maisnahrung zunächst unverändert, nimmt jedoch dann langsam, aber ununterbrochen ab und steigt vor dem Tode wiederun leicht an. Wenn wir den Kreatinin- und Kreatinstickstoff (in Summa) in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausdrücken, so sehen wir, daß in den ersten 4 Versuchswochen in Form von Kreatinin- und Kreatinstickstoff im allgemeinen in 24 Stunden ein und derselbe Prozentsatz des Gesamtstickstoffs des Harns (2,4 bis 2,8 Proz.) ausgeschieden wird; in der Folge jedoch nimmt diese Größe leicht ab, um in den letzten Tagen vor dem Tode einen Anstieg zu geben. Der *Kreatininkoeffizient*, d. h. die 24stündige Kreatinin- und Kreatinstickstoffmenge, umgerechnet auf Kilogramm Körpergewicht und ausgedrückt in Milligrammen, *weist* in der zweiten bis dritten Woche der Versuchsperiode (der Zeit, wo das Kreatin auftritt und seinen Höhepunkt erreicht) einen *leichten Anstieg auf*, der in dem angeführten Versuche nicht besonders stark, in den anderen stärker ausgesprochen ist, nimmt dann ab, um unter die Norm zu sinken. Auf diesen niedrigen Zahlen hält sich der *Kreatininkoeffizient* im Laufe des ganzen zweiten Monats und gibt nur in den letzten 2 bis 4 Tagen einen starken Anstieg.

Worauf weist nun ein solches Bild der Gesamtstickstoff-, Kreatinin- und Kreatinstickstoffausscheidung bei Kaninchen bei ausschließlicher

Tabelle I.

Datum	Körpergewicht	Zweitägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an					Kreatininkoeffizient	Futter
			Ges.-N	Ges.-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Ges.-N		
	g	ccm	g	g	g	g	Proz.		
12. IX.	2250	74	2,000	0,8	0,104	—	5,2	25,4	Normal ernährt (Hafer und Rüben)
14. IX.	2244	50	1,219	0,5	0,078	—	6,3	17,4	
22. IX.	2247	45	1,000	0,4	0,064	—	6,1	13,7	
24. IX.	2200	120	2,500	1,1	0,135	—	5,4	30,7	
26. IX.	2213	120	1,754	0,7	0,098	—	5,5	22,3	
Durchschn. pro Tag		**41**	**0,847**	**0,8**	**0,047**	—	**5,6**	**21,7**	
28. IX.	2203	150	2,564	1,1	0,101	—	3,9	23,0	Mais
30. IX.	2226	150	1,291	0,5	0,074	—	5,7	16,7	
2. X.	2172	150	1,369	0,6	0,075	—	5,4	17,5	
4. X.	2146	97	1,333	0,6	0,082	—	6,1	19,4	
6. X.	2046	165	2,083	1,0	0,100	0,010	5,2	27,0	
Durchschn. pro Tag		**71**	**0,864**	**0,8**	**0,043**	**0,005**	**5,2**	**20,6**	
8. X.	2024	130	1,369	0,6	0,067	0,004	5,1	17,7	Mais
10. X.	1940	160	1,724	0,8	0,082	0,008	5,2	23,5	
12. X.	1959	45	0,729	0,3	0,035	0,004	5,4	10,2	
14. X.	1863	200	2,083	1,1	0,093	0,015	5,1	29,0	
16. X.	1717	215	2,500	1,4	0,112	0,031	5,7	41,8	
Durchschn. pro Tag		**75**	**0,840**	**0,4**	**0,038**	**0,006**	**5,2**	**24,8**	
18. X.	1762	95	1,041	0,5	0,045	0,015	5,7	17,1	Mais
20. X.	1685	235	2,000	1,2	0,082	0,015	4,8	28,9	
22. X.	1654	220	1,630	0,9	0,068	0,002	4,2	21,1	
24. X.	1630	230	1,666	1,0	0,061	0,010	4,3	22,1	
26. X.	1639	275	1,428	0,8	0,066	0,006	5,0	20,9	
Durchschn. pro Tag		**105**	**0,776**	**0,4**	**0,032**	**0,004**	**4,8**	**21,8**	
3. XI.	1723	330	1,724	1,0	0,027	0,017	2,6	13,1	Mais
11. XI.	1705	335	1,428	0,8	0,035	0,006	2,8	12,1	
13. XI.	1671	257	1,111	0,6	0,055	0,002	5,1	17,3	
15. XI.	1665	195	1,112	0,6	0,047	0,003	4,5	15,1	
17. XI.	1666	195	0,833	0,4	0,033	0,003	4,3	10,3	
Durchschn. pro Tag		**136**	**0,620**	**0,3**	**0,019**	**0,003**	**3,8**	**13,4**	
19. XI.	1667	240	1,282	0,7	0,051	0,004	4,3	15,8	Mais
21. XI.	1629	160	0,952	0,5	0,032	0,003	3,7	10,0	
23. XI.	1630	245	1,298	0,7	0,045	0,001	3,5	13,3	
26. XI.	1622	240	1,332	0,8	0,050	0,004	4,1	16,7	
28. XI.	1572	117	1,428	0,9	0,046	0,005	3,5	16,5	
Durchschn. pro Tag		**102**	**0,629**	**0,3**	**0,023**	**0,002**	**3,8**	**14,4**	
30. XI.	1538	100	1,369	0,8	0,040	0,010	3,6	16,3	Mais
2. XII.	1494	100	1,317	0,8	0,042	0,005	3,6	16,1	
4. XII.	1456	107	1,562	1,0	0,046	0,007	3,3	18,4	
6. XII.	1390	110	1,041	0,7	0,029	0,007	3,4	13,2	
Durchschn. pro Tag		**52**	**0,673**	**0,4**	**0,019**	**0,003**	**2,8**	**16,0**	
8. XII.	1196	100	1,722	1,2	0,063	0,012	4,4	26,9	Mais
10. XII.	1112	350	2,500	2,0	0,042	0,079	4,8	31,0	Tot am 10. XII.
Durchschn. pro Tag		**112**	**1,055**	**0,8**	**0,026**	**0,023**	**4,6**	**37,4**	

Maisnahrung hin? Ist es demjenigen Bilde, das für die anderen Avitaminoseformen, z. B. für den Skorbut (*A. Palladin* und *A. Kudrjawzewa*) oder für diejenige Avitaminose festgestellt worden ist, die durch Füttern der Kaninchen mit im Autoklav erhitztem Hafer hervorgerufen wird (*Kudrjawzewa*) ähnlich? Wollten wir unsere Versuchsprotokolle mit denjenigen von *Kudrjawzewa*[1]) über die Kaninchenfütterung mit vitaminfreiem Hafer vergleichen, so würden wir in denselben ziemlich große Unterschiede feststellen können. Wenn auch die Gesamtstickstoffausscheidung dort fast das gleiche Bild darbietet, so verläuft die Kreatinin- und Kreatinausscheidung, besonders letztere, ganz anders. Dort nimmt die Kreatinausscheidung während der ganzen Avitaminoseperiode sowohl absolut als auch in Prozenten des Gesamtstickstoffs zu; dort wächst fortwährend der Kreatininkoeffizient. Wodurch läßt sich nun dieser Unterschied erklären? Im sterilisierten Hafer fehlen sämtliche drei Vitamingruppen, A, B und C, im Mais ist der B-Faktor in genügender Menge enthalten. Man könnte vielleicht denken, daß die Maisnahrung eine leichtere Avitaminoseform darstellt, da sie nur durch das Fehlen des C-Faktors und die Armut an A-Vitaminen bedingt ist. Nun wissen wir aber, daß die Kaninchen gegen das Fehlen von C-Vitaminen in der Nahrung unempfindlich sind; sie fühlen sich sehr wohl und zeigen keine krankhaften Symptome, wenn sie nur mit Hafer gefüttert werden, der den C-Faktor vermißt und auch arm an A-Vitaminen ist.

Daher scheint es uns, daß der Grund nicht im Fehlen des C-Faktors, sondern in der *biologischen Wertigkeit der Maiseiweiße* zu suchen ist. In dem Mais ist das minderwertige Zein vorherrschend. Wenn man außerdem den Appetitverlust der Kaninchen sowie den Umstand in Betracht zieht, daß sie nur geringe Maismengen zu sich nahmen, so wird es klar, daß sie nicht alle für sie notwendigen Aminosäuren in genügender Menge haben bekommen können. In der Literatur finden sich Angaben, daß die Fütterung der Tiere mit minderwertigen Eiweißen einen Appetitverlust sowie Weigerung derselben, die Nahrung in genügender Menge zu sich zu nehmen, hervorruft. Das Resultat davon ist ein Nichtsattessen, das auch in unseren Versuchen stattgefunden hat. Auf ein *Hungern* weisen auch die oben beschriebenen Störungen in der Kreatin-, Kreatinin- und Gesamtstickstoffausscheidung im Harn hin. Bekanntlich wirkt das Hungern auf die Ausscheidung dieser Harnbestandteile in ähnlicher Weise. Beim Hungern nimmt die Kreatinurie, ebenso wie in unseren Versuchen, zuerst zu, dann allmählich ab; im Hungerzustande nimmt der Kreatininkoeffizient zuerst zu, dann ab; im Hungerzustande, und zwar in seiner letzten Periode

[1]) *A. Kudrjawzewa*, diese Zeitschr. **154**, 104, 1924.

wird im Harn weniger Kreatinin und Kreatin (in Summa) ausgeschieden als vor dem Hungern an Kreatinin allein ausgeschieden worden war.

Daher muß angenommen werden, daß bei der Maisnahrung die Minderwertigkeit ihrer Eiweiße einen Einfluß auf den Stoffwechsel ausübt, infolge davon das Resultat des Fehlens von A- und C-Vitaminen im Mais verdunkelt wird und der Stickstoff- und Kreatinstoffwechsel uns ein Bild darbietet, das für den Hungerzustand charakteristisch ist.

Ein analoges Bild des Einflusses der Maisnahrung auf die Ausscheidung des Gesamtstickstoffs, Kreatinins und Kreatins gaben auch alle übrigen Versuche. Die betreffenden Protokolle sind wiedergegeben in den Tabellen II bis V.

Interessant ist, daß die *Stickstoffbilanz* in diesen Versuchen eine *negative* war. Eine negative Stickstoffbilanz wurde auch bei der Pellagra festgestellt.

II. Versuche mit Meerschweinchen.

Die Versuche mit Kaninchen zeigen, daß wir, nach dem Einfluß des Maises auf die Stickstoffwechselprozesse zu urteilen, bei der Maisnahrung keine reine Avitaminose bekommen; es tritt ein Hungern hinzu, das wahrscheinlich durch die Minderwertigkeit der Maiseiweiße bedingt ist.

Zur Kontrolle dieser Schlußfolgerung war es von Interesse nachzuprüfen, wie andere Tiere auf Mais reagieren. Wir stellten daher die weiter unten folgenden Versuche mit Meerschweinchen an.

Eine Partie Meerschweinchen wurde mit gewöhnlichem Mais (ganzen Körnern) gefüttert; eine andere mit im Autoklav bei 130° 3 Stunden lang erhitztem Mais; eine dritte gleichzeitig mit Mais und Rüben, um mit der Nahrung Vitamine zu verabreichen, die im Mais fehlen; eine vierte endlich bekam normale Nahrung, die aus Hafer und Rüben in derselben Menge bestand, wie sie die Meeschweinchen der dritten Partie erhielten. Während des ganzen Versuches, bis zum Tode, wurden die Meerschweinchen täglich morgens gewogen. Auf den hier angeführten Kurven sind die Resultate dieser Versuche dargestellt (siehe Abb. 1).

Wie aus diesen Kurven ersichtlich ist, verläuft die Gewichtskurve der Meerschweinchen, die mit Hafer und Rüben gefüttert wurden, mit leichten Schwankungen im allgemeinen fortwährend horizontal, oder sie steigt aufwärts. Anders verhält es sich mit der Maisnahrung. Die Gewichtskurve der Meerschweinchen, die nur mit Mais gefüttert wurden, beginnt von Anfang an zu sinken; dieses Sinken nimmt stärker zu und endigt in der dritten Woche mit dem Tode der Tiere.

Tabelle II.

Datum	Körpergewicht	Zweitägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an					Kreatininkoeffizient	Futter
			Ges.-N	Ges.-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Ges.-N		
	g	ccm	g	g	g	g	Proz.		
12. IX.	2420	55	2,000	0,8	0,104	—	5,2	21,6	Normal ernährt (Hafer und Rüben)
14. IX.	2424	65	2,000	0,8	0,123	—	6,1	25,5	
22. IX.	2399	59	1,666	0,6	0,114	—	6,8	23,8	
24. IX.	2398	75	2,222	0,8	0,135	—	6,0	28,2	
26. XI.	2400	130	2,222	0,9	0,123	—	5,4	25,5	
Durchschn. pro Tag		**26**	**1,011**	**0,4**	**0,059**	—	5,8	**24,8**	
28. IX.	2358	66	2,222	0,9	0,098	—	4,4	20,9	Mais
30. IX.	2255	117	1,785	0,7	0,093	—	5,2	20,6	
2. X.	2125	202	2,777	1,3	0,123	0,021	5,1	34,1	
4. X.	2045	220	2,222	1,0	0,093	0,019	5,0	27,5	
6. X.	1934	178	2,500	1,3	0,093	0,036	5,1	23,3	
Durchschn. pro Tag		**78**	**1,150**	**0,5**	**0,050**	**0,007**	4,8	**27,2**	
8. X.	1838	155	2,222	1,2	0,093	0,034	5,7	34,6	Mais
10. X.	1794	120	2,000	1,1	0,093	0,018	5,5	31,0	
12. X.	1830	65	1,111	0,6	0,064	0,003	6,0	18,5	
14. X.	1765	85	1,263	0,7	0,068	0,005	5,7	20,7	
16. X.	1720	107	1,219	0,7	0,056	0,003	4,9	17,6	
Durchschn. pro Tag		**58**	**0,781**	**0,4**	**0,037**	**0,006**	**5,4**	**24,4**	
18. X.	1685	120	1,449	0,8	0,063	0,016	5,4	23,6	Mais
20. X.	1675	115	1,724	1,0	0,062	0,016	4,5	23,4	
22. X.	1652	95	1,694	1,0	0,074	0,009	4,8	25,3	
24. X.	1654	100	1,666	1,0	0,069	0,008	4,0	23,6	
26. X.	1680	90	1,315	0,7	0,066	0,004	5,4	21,1	
Durchschn. pro Tag		**52**	**0,784**	**0,1**	**0,033**	**0,005**	**4,8**	**23,4**	
3. XI.	1587	85	1,315	0,8	0,030	0,016	3,4	14,7	Mais
7. XI.	1561	160	1,692	1,0	0,032	—	1,8	10,3	
9. XI.	1536	95	1,492	0,9	0,014	0,011	1,6	8,3	
11. XI.	1495	105	1,470	0,9	0,039	0,003	2,8	14,3	
13. XI.	1479	90	1,176	0,7	0,052	0,005	4,8	19,3	
Durchschn. pro Tag		**58**	**0,814**	**0,4**	**0,016**	**0,003**	**2,8**	**18,2**	
15. XI.	1482	70	1,000	0,6	0,040	0,003	4,3	14,6	Mais
17. XI.	1469	78	1,075	0,7	0,039	0,005	4,1	15,3	
19. XI.	1436	65	1,041	0,7	0,037	0,005	4,0	14,8	
21. XI.	1390	70	1,263	0,9	0,039	0,019	4,5	21,1	
23. XI.	1304	90	1,692	1,2	0,037	0,044	4,8	31,4	
Durchschn. pro Tag		**85**	**0,604**	**0,4**	**0,019**	**0,007**	**4,2**	**19,4**	
25. XI.	—	70	1,052	—	0,013	0,021	3,3	—	Tot am 25. XI.

Tabelle III.

Datum	Körpergewicht	Zweitägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an					Kreatininkoeffizient	Futter
			Ges.-N	Ges.-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Ges.-N		
	g	ccm	g	g	g	g	Proz.		
18. IX.	2787	380	2,867	1,0	0,148	—	5,1	26,6	Normal ernährt (Hafer und Rüben)
20. IX.	2619	220	2,702	1,0	0,140	—	5,1	26,7	
22. IX.	2646	398	2,702	1,0	0,135	—	4,9	25,5	
24. IX.	2629	214	2,500	0,9	0,140	—	5,6	26,4	
26. IX.	2633	372	2,666	1,0	0,133	—	4,9	25,4	
Durchschn. pro Tag		**158**	**1,343**	**0,4**	**0,069**	—	**2,5**	**26,0**	
28. IX.	2578	270	2,000	0,7	0,127	—	6,3	24,8	Mais
1. X.	2486	330	1,818	0,7	0,106	—	5,8	21,3	
3. X.	2582	220	1,666	0,6	0,106	—	6,3	24,4	
5. X.	2542	250	1,818	0,7	0,106	—	5,8	24,7	
7. X.	2652	145	1,052	0,3	0,058	0,004	5,9	11,9	
Durchschn. pro Tag		**121**	**0,835**	**0,3**	**0,050**	**0,004**	**3,1**	**21,4**	
9. X.	2497	355	2,173	0,8	0,109	0,012	5,5	24,3	Mais
11. X.	2427	280	2,083	0,8	0,089	0,002	4,4	18,9	
13. X.	2450	241	1,818	0,7	0,085	0,006	5,0	18,6	
15. X.	2392	250	1,666	0,6	0,093	0,002	5,7	20,0	
17. X.	2387	185	1,428	0,5	0,067	0,003	4,9	14,9	
Durchschn. pro Tag		**130**	**0,916**	**0,3**	**0,034**	**0,002**	**2,5**	**21,2**	
19. X.	2449	250	2,083	0,8	0,085	0,006	4,3	18,6	Mais
21. X.	2338	180	1,818	0,7	0,082	0,008	5,0	19,5	
23. X.	2328	285	2,083	0,8	0,082	0,005	4,2	18,9	
25. X.	2290	220	2,000	0,8	0,074	0,007	4,0	17,7	
Durchschn. pro Tag		**116**	**0,985**	**0,3**	**0,040**	**0,003**	**2,1**	**18,6**	
3. XI.	2167	295	2,500	1,1	0,048	0,011	2,3	13,8	Mais
7. XI.	2112	380	2,500	1,1	0,063	0,008	2,8	17,2	
9. XI.	2077	270	2,000	0,9	0,016	—	0,8	7,8	
Durchschn. pro Tag		**157**	**1,000**	**0,5**	**0,021**	**0,003**	**0,9**	**12,8**	Tot am 10. XI

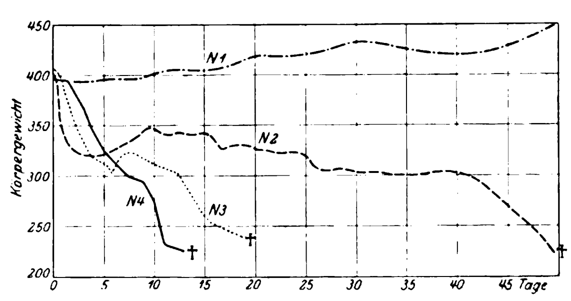


Abb. 1. Gewichtskurven der Meerschweinchen, die mit Hafer und Rüben (Kurve Nr. 1), mit Mais und Rüben (Kurve Nr. 2), mit Mais (Kurve Nr. 3) und mit autoklavisiertem Mais (Kurve 4) gefüttert wurden. Auf der Vertikalachse — Gewicht in Grammen.

Tabelle IV.

Datum	Körpergewicht g	Zweitägige Harnmenge ccm	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Ges.-N g	Ges.-N pro kg Körpergewicht g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	(Kreatinin + Kreatin)-N des Ges.-N Proz.	Kreatininkoeffizient	Futter
30. IV.	1924	50	1,098	0,5	0,059	—	5,3	15,5	Normal ernährt (Hafer und Rüben)
2. V.	1881	35	1,041	0,5	0,050	—	4,7	13,5	
4. V.	1892	47	2,040	1,0	0,100	—	4,9	27,2	
6. V.	1924	42	1,000	0,5	0,053	—	5,3	13,9	
8. V.	1932	47	0,934	0,4	0,053	—	5,6	13,7	
Durchschn. pro Tag		**22**	**0,611**	**0,2**	**0,031**	—	**2,5**	**16,6**	
10. V.	1980	—	0,602	0,3	0,018	0,003	3,6	5,5	Mais
12. V.	1916	72	0,602	0,3	0,018	0,003	3,6	5,7	
14. V.	1766	140	2,500	1,4	0,127	0,023	6,0	42,7	
20. V.	1731	135	0,724	0,4	0,047	0,006	7,4	15,6	
24. V.	1649	150	1,136	0,6	0,065	0,010	6,6	22,9	
Durchschn. pro Tag		**49**	**0,556**	**0,3**	**0,027**	**0,004**	**2,7**	**18,4**	
28. V.	1668	52	0,625	0,3	0,038	0,003	6,7	12,6	Mais
30. V.	1640	20	0,555	0,3	0,026	0,002	5,2	8,9	
3. VI.	1542	110	1,042	0,6	0,034	0,006	3,8	13,2	
5. VI.	1529	22	0,649	0,4	0,029	0,004	5,2	11,3	
7. VI.	1507	17	0,500	0,3	0,020	0,002	4,6	7,8	
Durchschn. pro Tag		**22**	**0,337**	**0,1**	**0,014**	**0,0007**	**2,5**	**10,6**	
9. VI.	1470	27	0,588	0,4	0,037	0,003	6,8	13,8	Mais
11. VI.	1375	91	1,724	1,2	0,042	0,027	4,0	25,4	
13. VI.	1380	45	0,909	0,6	0,015	0,002	1,9	6,5	
17. VI.	1314	50	1,086	0,8	0,058	0,008	6,0	25,4	
21. VI.	1342	40	0,384	0,2	0,021	0,001	5,9	8,8	
Durchschn. pro Tag		**25**	**0,469**	**0,3**	**0,017**	**0,004**	**2,4**	**15,8**	
23. VI.	1309	45	1,000	0,7	0,061	0,002	6,4	24,5	Mais
25. VI.	1290	28	0,625	0,4	0,033	0,002	5,7	14,0	
27. VI.	1301	30	0,833	0,6	0,039	—	4,6	15,0	
29. VI.	1305	20	0,555	0,4	0,035	—	6,3	13,5	
Durchschn. pro Tag		**15**	**0,376**	**0,2**	**0,021**	**0,0005**	**2,8**	**16,0**	

War der Mais im Autoklav erhitzt worden, so nahmen die Meerschweinchen noch schneller an Gewicht ab und gingen noch rascher ein. Die Versuche haben somit gezeigt, daß die Meerschweinchen mit Mais allein sich nicht nähren können und bei solcher Nahrung schnell eingehen. Man könnte zu der Annahme geneigt sein, daß die Todesursache der Meerschweinchen im Fehlen der C-Vitamine im Mais zu suchen ist, da das Füttern derselben mit Hafer und Körnern anderer Grasarten, die den C-Faktor vermissen, Skorbut hervorruft, der gewöhnlich nach 3 bis 4 Wochen zum Tode der Tiere führt. Die Gewichtskurve der Meerschweinchen, die mit Mais und Rüben (40 g) gefüttert wurden,

Tabelle V.

Datum	Körpergewicht	Zweitägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Ges.-N	Ges.-N pro kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatin-N	(Kreatinin + Kreatin)-N des Ges.-N	Kreatininkoeffizient	Futter
	g	ccm	g	g	g	g	Proz.		
20. IV.	1713	60	0,602	0,3	0,024	—	3,9	7,1	Normal ernährt (Hafer und Mais)
22. IV.	1760	75	0,793	0,4	0,058	—	7,3	16,5	
24. IV.	1800	80	0,909	0,5	0,050	—	5,5	14,0	
26. IV.	1832	135	1,428	0,7	0,086	—	6,0	23,5	
28. IV.	1863	112	1,123	0,6	0,069	—	6,1	18,7	
Durchschn. pro Tag		**46**	**0,485**	**0,2**	**0,028**	—	**2,8**	**15,8**	
30. IV.	1881	50	0,666	0,3	0,040	—	6,0	10,8	Mais
2. V.	1843	43	0,840	0,4	0,058	—	6,9	15,7	
4. V.	1812	35	0,714	0,3	0,061	0,001	8,8	17,3	
6. V.	1809	40	0,943	0,5	0,075	0,001	8,1	22,0	
12. V.	1827	50	0,340	0,1	0,024	0,005	8,7	8,2	
Durchschn. pro Tag		**21**	**0,350**	**0,1**	**0,025**	**0,0007**	**3,9**	**14,8**	
14. V.	1709	94	2,000	1,1	0,127	0,023	7,5	14,2	Mais
18. V.	1612	83	0,833	0,5	0,053	0,018	8,5	22,2	
20. V.	1527	90	2,000	1,3	0,098	0,032	6,5	43,0	
24. V.	1412	180	1,666	1,1	0,093	0,016	6,5	38,9	
28. V.	1389	88	1,042	0,7	0,049	0,008	5,4	20,6	
Durchschn. pro Tag		**55**	**0,754**	**0,4**	**0,042**	**0,009**	**3,4**	**33,6**	
30. V.	1417	41	1,136	0,8	0,054	0,010	5,7	23,0	Mais
3. VI.	1438	95	0,658	0,4	0,035	0,013	7,2	16,9	
5. VI.	1448	75	0,787	0,5	0,063	0,008	9,1	25,0	
7. VI.	1494	98	0,729	0,4	0,053	0,007	8,3	21,2	
9. VI.	1507	70	0,561	0,3	0,052	0,002	9,8	18,2	
Durchschn. pro Tag		**37**	**0,387**	**0,2**	**0,025**	**0,004**	**4,0**	**20,8**	
13. VI.	1527	112	1,000	0,6	0,036	0,001	3,7	12,3	Mais
17. VI.	1702	75	0,357	0,2	0,034	0,002	10,0	10,8	
21. VI.	1733	137	0,439	0,2	0,033	0,006	9,1	11,6	
23. VI.	1700	88	0,470	0,5	0,082	0,004	9,6	25,5	
25. VI.	1704	75	0,666	0,3	0,049	0,002	7,8	15,3	
Durchschn. pro Tag		**48**	**0,334**	**0,1**	**0,028**	**0,001**	**4,9**	**15,0**	
27. VI.	1706	83	0,555	0,3	0,055	—	9,9	16,1	Mais
29. VI.	1746	75	0,625	0,3	0,052	—	8,3	15,1	
Durchschn. pro Tag		**44**	**0,259**	**0,1**	**0,027**	—	**4,5**	**15,6**	

spricht jedoch dafür, daß die Todesursache nicht im Fehlen des C-Faktors allein zu suchen ist. Diese Nahrung ist keine vitaminfreie, da die Rüben die C-Vitamine in vollständig ausreichender Menge enthalten. Trotzdem gingen die Meerschweinchen, wenn auch nach längerer Zeit, schließlich ein, was bei denjenigen, die mit Hafer und Rüben gefüttert wurden,

nicht der Fall war. *Wir müssen daher die Todesursache in diesem Falle in den Eiweißen des Maises erblicken, die auch für die Meerschweinchen als nicht völlig vollwertig sich erwiesen.*

Aus diesen Versuchen mit Kaninchen und Meerschweinchen ist der Schluß zu ziehen, daß der Mais, nach den Resultaten seines Einflusses auf die Stickstoffwechselprozesse bei Kaninchen und das Gewicht der Meerschweinchen zu urteilen, nicht als ein völlig vollwertiges Nahrungsprodukt angesprochen werden kann; diese seine Minderwertigkeit ist nicht nur durch das Fehlen der C-Vitamine in demselben und durch seine Armut an A-Vitaminen bedingt, sondern auch durch die ungenügende biologische Wertigkeit seiner Eiweiße.

Diese Minderwertigkeit der Maiseiweiße spielt zweifellos eine Rolle in der Ätiologie der Pellagra, und *Goldberger* und *Tanner*[1]) haben vielleicht recht, wenn sie behaupten, daß die Ursache der Pellagra nicht im Fehlen irgend eines Vitamins zu suchen ist, sondern in dem geringen Gehalt biologisch vollwertiger Eiweiße; die Armut des Maises an C- und A-Vitaminen trägt deshalb zur Entstehung der Pellagra bei, weil sie den Organismus der Möglichkeit beraubt, selbst jenes vollwertige Eiweiß, das im Mais enthalten ist, in vollem Maße auszunutzen. Ein weiteres begünstigendes Moment für die Pellagra stellt der Reichtum des Maises an Kohlehydraten dar. Nicht ohne Grund verschwinden die Pellagraerkrankungen, sobald der Mais aufhört, das Hauptnahrungsmittel zu sein, und die Bevölkerung außer dem Mais noch andere Nahrungsprodukte zu genießen beginnt, die reicher an vollwertigem Eiweiß und ärmer an Kohlehydraten sind.

[1]) *Goldberger* und *Tanner*, Journ. Amer. med. Ass. **79**, 2102, 1922.

Physikalisch-chemische Untersuchungen über die Harnsäure.

III. Mitteilung:

Über die Natur der hydrotropisch übersättigten Harnsäurelösung.

Von

Rudolf Stern.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 1. April 1925.)

In einer früheren Mitteilung (1) wurde gezeigt, daß die Natriumsalze der Salicylsäure und der Phenylchinolincarbonsäure bereits in der Konzentration von 0,1 Proz. die Löslichkeit der Harnsäure in Wasser bis auf das Dreifache der echten Löslichkeit heraufsetzen. Ich habe dort bereits ausgeführt, warum diese Steigerung der Löslichkeit der Harnsäure nicht lediglich auf einer etwaigen Bildung von Natriumurat beruhen kann. Es würde zu weit führen, hierauf nochmals einzugehen. Nach wie vor scheint es überwiegend wahrscheinlich, daß es sich hier um einen hydrotropischen Effekt handelt, wie ja auch schon *Neuberg* (2) angenommen hatte, daß die Harnsäure hydrotropisch beeinflußbar sei. Es schien nun von großem Interesse, ob man über die Natur der hydrotropisch übersättigten Harnsäurelösung etwas aussagen kann, um so mehr, als nicht nur für die Harnsäure, sondern für die hydrotropischen Phänomene ganz allgemein noch keine sichergestellte Erklärung vorhanden ist. Das Sammeln experimenteller Beobachtungen muß unter solchen Umständen von Nutzen sein.

Ich habe schon in der vorigen Mitteilung gezeigt, daß es sich bei der von mir beschriebenen Erscheinung nicht um eine gewöhnliche Übersättigung handelt; denn sonst wäre bei dem mehrstündigen Schütteln mit dem Bodenkörper zweifellos der übersättigt gelöste Anteil an Harnsäure wieder ausgefallen. Ich habe auch erwähnt, daß durch den Zusatz von 0,1 Proz. Atophannatrium das p_H des Lösungswassers in kolorimetrisch meßbarer Weise nicht beeinflußt wird; und die Abhängigkeit der Löslichkeit der Harnsäure vom p_H ist nicht so groß, daß geringfügige, nur elektrometrisch wahrnehmbare Verschiebungen

eine auch nur annähernd so erhebliche Änderung der Löslichkeit verursachen könnten. Wenn es sich also bei den beobachteten Phänomenen weder um die Bildung von dem ja leichter löslichen Natriumurat, noch um einfache Übersättigung, noch um entscheidende Veränderung der Beschaffenheit des Lösungsmittels handelt, so bleiben eigentlich nur zwei Erklärungsmöglichkeiten übrig: Es könnte sich um relativ stabile Kolloidbildung der Harnsäure unter dem Einfluß des Atophans handeln, oder aber um lockere, chemisch nicht definierte Verbindungen zwischen den Molekülen des Atophannatriums und der Harnsäure. Die letztere Möglichkeit entspricht wohl am meisten den Vorstellungen, die *Neuberg* (2) über das Wesen des hydrotropischen Phänomens geäußert hat (Nebenvalenzaffinitäten).

Die erste Möglichkeit war trotzdem nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Abgesehen von den sehr bemerkenswerten Beobachtungen von *Schade* (3) habe ich mich selbst davon überzeugt [vgl. eine frühere Mitteilung (4)], daß man unter Umständen sehr charakteristische und relativ beständige Hydrosole von Natriumurat erhalten kann. Gerade angesichts der Schwierigkeit, solche Sole beliebig zu reproduzieren, hatte ich schon damals darauf hingewiesen, daß verunreinigende Beimengungen bereits in minimalster Konzentration auf die Entstehung und das Wachstum von Kolloidteilchen von entscheidendem Einfluß sein können. Ich habe deshalb hydrotropisch übersättigte Harnsäurelösungen daraufhin untersucht, ob sie irgendwie den Charakter von Hydrosolen zeigten. Ich habe bei diesen Untersuchungen auf die Methode der Viskositätsmessung verzichtet, da ich bereits früher (4) zeigen konnte, daß selbst viel konzentriertere Harnsäurelösungen, als sie durch den verwendeten hydrotropischen Effekt hergestellt werden, keine nennenswerte und keine sichere Viskositätserhöhung gegenüber dem destillierten Wasser zeigen. Ich habe mich auf die Untersuchung des Tyndallphänomens und des ultramikroskopischen Bildes beschränkt; die Untersuchung mit dem Spaltultramikroskop ist zweifellos die sicherste Methode, Teilchen von kolloidaler Größenordnung in einer Lösung nachzuweisen. Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich nun, daß die hydrotropisch übersättigten Harnsäurelösungen sich optisch nicht anders verhielten als die ohne hydrotropischen Zusatz echt gesättigten, d. h. nicht anders als destilliertes Wasser. Da dies nicht nur bei frisch hergestellten Lösungen der Fall war, sondern auch bei solchen, deren Herstellung fast 1 Jahr zurücklag, und bei denen man also, wenn in ihnen kolloidale Bestandteile vorhanden waren, mit Sicherheit Alterungserscheinungen annehmen mußte, so kann man wohl mit Sicherheit behaupten, daß bei der Löslichkeitsbeeinflussung durch das Atophan Kolloidbildung nicht im Spiele ist.

Um nun die zweite der oben als möglich hingestellten Vermutungen noch weiter zu stützen, schien es zweckmäßig, die Wasserstoffionenkonzentration der hydrotropisch übersättigten Lösung im Vergleich zu den echt gesättigten zu bestimmen. Denn es war klar, daß nichts überzeugender gegen die erste und für die zweite Möglichkeit sprechen könnte, als wenn es gelänge nachzuweisen, daß der mehr gelösten Harnsäure auch eine größere Konzentration von Wasserstoffionen entspräche.

Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Löslichkeit der Harnsäure ist vielfach untersucht worden, besonders von *Kohler* (5) und *Jung* (6). Bei mir handelte es sich aber um eine andere Fragestellung. Es sollte nicht der Einfluß von variiertem p_H auf die Löslichkeit bzw. die Übersättigungsmöglichkeit der Harnsäure festgestellt werden, es sollte vielmehr untersucht werden, ob in der hydrotropisch übersättigten, sonst aber unter gleichen Bedingungen hergestellten Lösung von Harnsäure ein hinreichend deutliches Kleinerwerden von p_H stattfindet. Zu diesem Zwecke mußten vor allem zwei Punkte genau berücksichtigt werden: 1. das p_H des Lösungswassers und 2. seine etwaige Änderung durch den Zusatz von 0,1 Proz. Atophannatrium[1]). Es ist nämlich ohne weiteres klar, daß bei einer so schwachen Säure wie der Harnsäure das p_H des Lösungswassers, das sonst bei der Messung von Wasserstoffionenkonzentrationen meistens vernachlässigt werden kann, von außerordentlicher Bedeutung ist. Es steht dies nicht im Widerspruch mit der früher ausgesprochenen und eingangs wiederholten Behauptung, daß die Löslichkeit der Harnsäure durch relativ geringfügige p_H-Schwankungen fast unbeeinflußt bleibt. Denn hier handelt es sich ja nur um die Messung der aktuellen H-Ionen, für die nur der kleine Teil von Harnsäuremolekülen, der dissoziiert ist, in Frage kommt. Und da nach der Dissoziationskonstanten der Harnsäure das p_H einer gesättigten Lösung größer als 5,0 sein muß, die Wasserstoffionenkonzentration für eine ungepufferte Lösung also außerordentlich klein ist, so wird der Einfluß des Wasserfehlers sofort einleuchten, wenn wir uns nur daran erinnern, daß gewöhnlich destilliertes Wasser (schon unter dem Einfluß der Luftkohlensäure) im allgemeinen ein p_H von 5,0 bis 5,5 aufweist. Aus genau dem gleichen Grunde ist es einleuchtend, daß wir bei *diesen* Untersuchungen die Vergrößerung des p_H, die das Lösungswasser durch den Zusatz von Atophannatrium (dem Alkalisalz einer schwachen Säure!) erfährt,

[1]) Die folgenden Untersuchungen wurden lediglich an Lösungen mit diesem Zusatz gemacht, da der hydrotropische Effekt hierbei viel deutlicher ist als beim Zusatz von salicylsaurem Natron. Für die Überlassung chemisch reinen Atophannatriums sage ich der Chem. Fabrik auf Aktien vorm. Schering besten Dank.

unbedingt berücksichtigen müssen, während wir diese Änderung für die Löslichkeit von Harnsäure überhaupt als nicht ausschlaggebend bezeichnen dürfen.

Bei der Feinheit der zu erwartenden Unterschiede kam nur die elektrometrische Messung der H-Ionen in Betracht. Schon die letzterwähnte Fehlerquelle (Änderung des p_H des Wassers durch 0,1 Proz. Atophannatrium) war ja, wie ich früher ausgeführt hatte, kolorimetrisch gar nicht in Erscheinung getreten, während ich weiter unten zeigen werde, daß sie bei elektrometrischer Messung außerordentlich deutlich ist. Die kolorimetrische Bestimmung von p_H ist eben in der Nähe des Neutralpunktes nur dann mit einiger Präzision möglich, wenn die zu untersuchenden Lösungen leidlich gepuffert sind. Es ist zwar *Biltz* (7) und seinen Mitarbeitern gelungen, mittels der *Sörensen*schen Methode (8) recht genaue Resultate bei Harnsäurelösungen zu erhalten, die auch innerhalb der Fehlergrenzen mit den von mir gefundenen gut übereinstimmen. Da es mir aber darauf ankommen mußte, auch noch die sehr geringen Unterschiede, wie sie zwischen hydrotropisch übersättigten und echt gesättigten Lösungen höchstens erwartet werden können, präzise zu fixieren, so mußte ich die Größe der Messungsfehler auf das denkbar kleinste Maß herabschrauben; und es ist kein Zweifel, daß dies lediglich mit Hilfe der elektrometrischen Methode, der Standardmethode der p_H-Messung, möglich ist[1]).

Die Anordnung meiner Versuche war zunächst im wesentlichen die gleiche, wie ich sie in der vorigen Mitteilung S. 269 beschrieben habe. Die verwendete Harnsäure war ein besonders gereinigtes und mehrfach umkristallisiertes Präparat, für dessen Überlassung ich Herrn Dr. *Zocher* zu bestem Danke verpflichtet bin. Als Wasser verwendete ich aus den oben angeführten Gründen in verschiedenen Versuchsreihen gewöhnliches destilliertes Wasser, Leitfähigkeitswasser von *Kahlbaum* und im Quarzkühler von mir selbst redestilliertes Wasser. Aus äußeren Gründen ging ich bald dazu über, die Lösungen nur mit 100 statt mit 2000 ccm Wasser herzustellen. Ich hielt es nicht für nötig, die Harnsäurekonzentration in jeder neu hergestellten Lösung festzustellen, nachdem ich mich durch Stichproben davon überzeugt hatte, daß der hydrotropische Effekt quantitativ derselbe war wie in meinen früheren Untersuchungen. Da mir ein Schüttelthermostat nicht zur Verfügung stand, mußte ich mich wieder damit begnügen, bei ungefähr 16° C die Schüttelversuche vorzunehmen. Die Rotations-

---

[1]) Ich bin Herrn Prof. Dr. *Freundlich* zu besonderem Danke verpflichtet, daß er mir die Ausführung dieser Messungen in der ihm unterstellten Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für physikalische Chemie und Elektrochemie ermöglicht hat.

dauer betrug 4 bis 5 Stunden. Unmittelbar nach dem Schütteln und Filtrieren erfolgte das Messen von p_H, und zwar in einem Thermostaten, der bei einem Teile der Versuche auf 25° C, bei einem anderen Teile auf 20° C eingestellt war. Eine Einstellung des Thermostaten auf 16° C war aus äußeren Gründen nicht möglich; auf die Anwendung des Thermostaten bei der elektrometrischen Messung wollte ich aber nicht verzichten, da mir auf die Genauigkeit dieser Messung alles ankam. Eher konnte ich in Kauf nehmen, daß die p_H-Messung bei etwas höherer Temperatur als der Schütteltemperatur erfolgte, da dies nur ein Schönheitsfehler war, der die zu vergleichenden Lösungen in völlig gleicher Weise betraf. Ich bin mir vollkommen bewußt, daß in diesen wie in anderen Punkten die Versuchsanordnung sehr viel schöner sein könnte und sein müßte, wenn es sich um die Ermittlung physikalisch-chemischer Konstanten der gesättigten Harnsäurelösung handeln würde. Ich betone, daß es mir hier wie schon in der vorigen Mitteilung lediglich darauf ankam, die hydrotropisch beeinflußte und die echt gesättigte Lösung unter völlig gleichen Bedingungen zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke mußte ein Teil der ohne Zusatz gesättigten Harnsäurelösung nachträglich (d. h. das Filtrat nach dem Schütteln) auf die gleiche Konzentration an Atophannatrium gebracht werden wie die von vornherein mit Atophannatrium geschüttelte und hydrotropisch übersättigte Harnsäurelösung. Nur so konnten Vergleichsdaten gewonnen werden, da ich ja schon oben dargetan habe, daß die Anwesenheit des Atophannatriums eine Verschiebung des p_H nach der alkalischen Seite bewirkt. Es war also bei jedem Versuch das p_H von fünf Lösungen zu messen:

1. das zum Versuch verwendete Wasser,
2. eine 0,1 proz. Lösung von Atophannatrium in eben diesem Wasser,
3. das Filtrat der mit diesem Wasser geschüttelten Harnsäure,
4. das Filtrat der mit diesem Wasser und 0,1 Proz. Atophannatrium geschüttelten Harnsäure,
5. die Lösung Nr. 3, nachträglich auf die gleiche Konzentration an Atophannatrium gebracht wie Lösung Nr. 4.

Die entscheidende Tatsache war dann, ob in Lösung Nr. 4 in deutlicher und konstanter Weise ein kleineres p_H, also eine größere Wasserstoffionenkonzentration vorhanden war als in Lösung Nr. 5. Daß das p_H nicht kleiner, sondern vielmehr größer sein mußte als in Lösung Nr. 3, war aus den oben angeführten Überlegungen von vornherein klar.

Die Messung der Wasserstoffionenkonzentrationen geschah nun mit der üblichen, im wesentlichen von *L. Michaelis* ausgearbeiteten Kompensationsmethode (Walzenbrücke, Kapillarelektrometer). Als Bezugselektrode diente eine gesättigte Kalomelelektrode; als Wasserstoffelektrode verwendete ich die auf Grund der Versuche von *Haber* und *Russ* (9) ausgearbeitete Chinhydronelektrode, die ein sehr viel rascheres und bequemeres Arbeiten gestattet als die ursprüngliche Elektrode von *Michaelis* (mit atmosphärischem Wasserstoff beladenes Platinmohr). Die Bedingungen, unter denen man mit der Chinhydronelektrode ebenso sichere Resultate erhält wie mit der Wasserstoffelektrode, sind neuerdings ebenso genau ermittelt worden wie die zweckmäßige Technik dieser Messung überhaupt [*Billmann*, *Auerbach* u. a. (10 bis 15)]. Ich verweise auf diese Arbeiten hinsichtlich der Theorie und Praxis der Chinhydronelektrode. Daß sie für meine Messungen unbedenklich angewendet werden konnte, war klar, da ich im eigentlich alkalischen Gebiete nicht zu arbeiten hatte.

Ich gebe nun im folgenden eine Tabelle ausgewählter Versuchsresultate, aus der sich das Verhalten der oben gekennzeichneten fünf Lösungen in verschiedenen Versuchen ersehen läßt.

Typische Versuchsprotokolle von p_H-Messungen.

Datum	Temperatur	1 Lösungswasser	2 0,1 Proz. Atophannatrium	3 Bei 16° gesättigter Harnsäurelösung	4 Mit 0,1 Proz. Atophannatrium hydrotropisch übersättigte Harnsäurelösung	5 Nr. 3 nachträglich auf 0,1 Proz. Atophannatrium gebracht
6. III.	25°	6,010	7,062	5,025	5,792	6,061
7. III.	26	6,157	6,929	5,172	5,869	6,344
9. III.	20	6,021	6,725	5,231	6,021	6,585
10. III.	20	5,759	6,639	5,215	6,005	6,497

Es geht aus dieser Tabelle wohl einwandfrei hervor, daß das, was ich oben als die entscheidende Frage bezeichnet habe, in dem Sinne entschieden ist, daß die hydrotropisch mehr gelöste Harnsäure auch eine deutliche Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration bewirkt. Und zwar ist der Unterschied ein so großer, daß man durch ungefähre Abschätzung bereits zu der Vermutung kommt, daß nicht nur ein Teil, sondern daß die ganze mehr gelöste Harnsäure ungefähr im gleichen Umfange dissoziiert ist wie die echt gelöste Harnsäure. Man wird also aus diesem Resultat den Schluß ziehen dürfen, daß in der Tat der hydrotropische Effekt auf einer Bildung von lockeren, dissoziationsfähigen Verbindungen zwischen den Molekülen des Atophans und der

Harnsäure beruht[1]). Die Tatsache, daß die Harnsäure, und zwar auch in Fällen, in denen es sich sicher nicht um eine kolloidale Form derselben handelt, solche lockeren, durch Valenzgesetze nicht bestimmbare Verbindungen eingehen kann, erscheint recht bemerkenswert, wenn wir uns an die bisher durchaus nicht widerlegte Hypothese *Minkowskis* (16) erinnern, derzufolge eine Verbindung zwischen Nucleinsäure und Harnsäure „den Transport der Harnsäure zu vermitteln und sie in der Norm in der Niere abzugeben hätte, während unter pathologischen Verhältnissen die Harnsäure in der Nucleinsäureverbindung festgehalten und erst in bestimmten Geweben abgespalten und abgelagert würde".

Die Versuche sollen in dieser Richtung fortgesetzt werden.

Literatur.

1) *R. Stern*, Diese Zeitschr. **151**, 1924. — 2) *Neuberg*, ebendaselbst **76**. — 3) *Schade*, Zeitschr. f. klin. Med. **98**. — 4) *R. Stern*, diese Zeitschr. **150**. — 5) *Kohler*, Zeitschr. f. klin. Med. 87, **97**. — 6) *Jung*, Helvetica chinica acta **5**, 1922; **6**, 1923. — 7) *H. Biltz* und *Herrmann*, Ber. 1921, S. 1676. — 8) *Sörensen*, diese Zeitschr. **21**. — 9) *F. Haber* und *Russ*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **45**, 1904. — 10) *Billmann*, Ann. de chin. 1921. — 11) *Auerbach-Smolczyk*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **110**. — 12) *Veibel*, Journ. of the chem. soc. **123/124**, 1923. — 13) *Lamer-Parsons*, Journ. of biol. Chem. **57**, 1923. — 14) *Dieselben*, Proc. of the soc. f. exper. biol. **20**, 1923. — 15) *Schäfer-Schmidt*, diese Zeitschr. **156**, 1925. — 16) *Minkowski*, Mediz. Klinik. Jahrg. 1913. Nr. 20.

---

[1]) Übrigens hat schon Jung (l. c.) die Bildung „komplexer Salze" zwischen Harnsäure und Phosphat-Boratlösungen angenommen, als er den Einfluß von variiertem p_H auf sehr stark übersättigte (offenbar unstabile) Harnsäurelösungen untersuchte.

Chemisch-bakteriologische Faktoren beim Reifen der Käse.

I. (chemischer) Teil.

Von

J. Zaykowsky und N. Slobodska-Zaykowska.

(Aus dem milchwirtschaftlichen Institut zu Wologda, Rußland.)

(Eingegangen am 8. März 1925.)

Die Frage nach dem Reifen der Käse nahm und nimmt bis jetzt in der Spezialliteratur eine der ersten Stellen ein.

Duclaux, Freudenreich, Orla-Jensen, Burri, Bartel, Rodella, Gorini, Weigmann und viele andere haben sich mit der Aufklärung dieser Frage beschäftigt und sind nicht selten zu widersprechenden Ergebnissen gekommen. Die Arbeiten fast aller dieser Forscher waren auf die Untersuchung der Rolle der einzelnen Faktoren gerichtet, dagegen wurde die Erforschung des Zusammenwirkens verschiedener Faktoren, welche die eine oder andere Rolle in dem Prozeß der Käsereifung spielen können, sehr stark vernachlässigt. Obwohl den physikalisch-chemischen Erscheinungen bei der Reifung der Käsemasse von vornherein eine große Bedeutung zugemessen werden kann, so ist doch in der Literatur nur eine einzige Arbeit vorhanden, welche die Frage der Käsereifung von diesem Standpunkt behandelt.

In letzter Zeit macht sich mehr und mehr die Ansicht geltend, daß bei der Reifung der Käse den Milchsäurebakterien die Hauptrolle aus der Gruppe der mikrobiologischen Elemente zufällt. Außerdem wird dem Ferment, das bei dem Gerinnen der Milch eingeführt wird, einige Bedeutung zugeschrieben. Ob dieses Ferment Chymosin oder Pepsin ist, bleibt bis jetzt ungeklärt, soweit nicht das Wesen dieser beiden Fermente festgestellt worden ist. Bekanntlich halten einige Autoren das Chymosin und das Pepsin für gleichwertig; nach der Ansicht anderer Forscher, die wohl einen Unterschied zwischen diesen Fermenten voraussetzen, spielt bei der Reifung der Käsemasse ausschließlich das Pepsin eine Rolle, das zusammen mit dem Labferment eingeführt wird, und nicht das Chymosin, dem nur eine Bedeutung bei dem Gerinnen der Milch zugeschrieben wird. Die letztere Auffassung wird zum Teil durch die Versuche von *Stephenson* (1) bestätigt, der gut gereifte Käse bei Verwendung von Pepsin statt Labferment erzielte. Allein durch die letzten Versuche des einen von uns (2) wurde erwiesen, daß das reine Chymosin (Labferment), das vollkommen von Pepsin (das Hühnereiweiß nicht löst) befreit ist, nach dem Gerinnen der Milch das ausgeschiedene Casein wieder auflöst, also über proteolytische Eigenschaften verfügt. Das von *Petri* in frisch bereiteten Käsen aufgefundene Ferment,

das von ihm Casease genannt wurde (da es spezifisch nur auf Casein ein wirkt) und nicht in der Milch auftritt, ist wahrscheinlich mit dem Chymosin identisch. Die von anderen Forschern aufgefundenen Fermente, z. B. Galaktase [*Babkock* und *Russel* (3)] spielen wohl kaum eine wesentliche Rolle bei der Reifung der Käsemasse.

Von den Arbeiten, die eine ganze Theorie auf dem Gebiet der Käsereifung geschaffen haben und lange Zeit die Spezialisten beschäftigten, sind diejenigen von *Duclaux* zu erwähnen, der dort die Ansicht vertritt, daß der hauptsächlichste mikrobiologische Faktor beim Reifen der Käsemasse ein spezieller Mikroorganismus ist, der an die Heubakterien erinnert, und dem er den Namen Tyrothriks gibt. Diese Auffassung, von der man jetzt gänzlich abgegangen ist, hatte zahlreiche Anhänger, von denen einer, *Adametz*, sogar eine besondere Art Käsegärungserreger bereitete, den er Tyrogen nannte, und der die erwähnten Tyrothriks enthielt. Die Versuche, die mit diesem Präparat ausgeführt wurden, gaben verhältnismäßig befriedigende Resultate.

Die Arbeiten von *Freudenreich* stellten den Beginn einer neuen Erklärungsweise des Reifeprozesses in den Käsen dar. Das fast ausschließliche Vorhandensein von Milchsäurebakterien, das nur sporadische Auftreten von sporenbildenden Formen, wie Tyrothriks, der unbedeutende Gehalt an verflüssigenden Formen, alles dieses veranlaßte *Freudenreich*, seine Aufmerksamkeit auf die Milchsäuremikroben zu richten und ihre Eigenschaften bei der versuchsweisen Käsebereitung genau zu studieren. Als Ergebnis seiner Untersuchungen ist bekannt, daß die Käse, die aus entkeimter Milch unter Zusatz reiner Kulturen von Milchsäurebakterien (die von ihm aus Käse gewonnen wurden) sowie mit einer normalen Menge Labferment hergestellt wurden, ein Produkt darstellen, das dem in gewöhnlicher Weise zubereiteten Käse sehr nahe steht. Es hat sich sogar herausgestellt, daß die Käse, die mit Zusatz von Labferment allein hergestellt worden sind, bis zu einem gewissen Grade reifen. In jedem Falle sprechen seine Versuche schon in dem Sinne, daß man, wenn auch die Milchsäurebakterien und Streptokokken eine Hauptrolle unter den Mikroben spielen, auch nicht die chemischen Stoffe vergessen darf, die bei der Käsebereitung in die Käsemasse eingetragen werden, nämlich das Labferment und das Salz.

Unter die chemischen Stoffe, die von Bedeutung für die Reifung der Käsemasse sind, muß man auch die Milchsäure rechnen. Die Wichtigkeit der Milchsäure tritt noch mehr hervor, wenn man bedenkt, daß die Hauptlebensfunktion der Milchsäuremikroben eben die Bildung von Milchsäure ist, und wie die Forschungen vieler Autoren ergeben haben, hängen die Vorzüge und viele Mängel der Käse von dem Überschuß bzw. dem Mangel an Milchsäure ab [*van Dam* (4), *de Vries* und *Bockhout* (5), *Russel* u. a. (6)].

Die Versuche, die von vielen Forschern zur Herstellung von Käse ohne Labferment ausgeführt wurden, haben zu keinen erfolgreichen Ergebnissen geführt, soweit in diesen Versuchskäsen ausschließlich Milchsäuremikroben vorhanden waren.

Die Rolle des zum Käse hinzugesetzten Kochsalzes beschränkt sich natürlich nicht nur auf seine konservierenden Eigenschaften; es versteht sich von selbst, daß dem Salze auch eine große Bedeutung bei der Bildung des Käseteiges in der Lösung des Eiweißstoffes zukommt usw., kurzum überhaupt bei den physikalisch-chemischen Prozessen, die im Verlauf der Käsereifung vor sich gehen.

Aus allem bisher Gesagten geht deutlich hervor, daß diese drei Faktoren, nämlich das Chymosin, die Milchsäure und das Kochsalz, im Zusammenwirken mit nicht weniger wichtigen Faktoren, und zwar der Zeit und der Temperatur, eine gewisse und nicht untergeordnete Rolle bei der Reifung der Käse spielen. Natürlich haben die Fermente, die von den Mikroben im Käse ausgeschieden werden, eine nicht weniger schwerwiegende Bedeutung, wobei von diesen Mikroben die Milchsäuremikroben die Hauptrolle spielen, indem sie die Milchsäure bilden und einen Teil des Eiweißstoffes lösen. Aber auch andere Mikrobenarten sind nicht weniger wichtig, indem sie wahrscheinlich dem Käse den entsprechenden Geschmack und Geruch verleihen.

In den bis jetzt erschienenen Arbeiten wird die Frage nach der Bedeutung dieser Faktoren fast gar nicht berührt, sondern der Schwerpunkt auf die mikrobiologischen Erscheinungen verlegt. Wenn auch in einzelnen Fällen die Rolle des einen oder des anderen der genannten Elemente erklärt wird, so geschieht dies doch nur zu dem Zwecke, um die Fehler der Käse aufzudecken. So erklären z. B. *Bockhout* und *de Vries* (5) den Fehler „kort" (kurz) durch den Überschuß an Milchsäure, und die weißen Flecken durch die Unlöslichkeit der im Käse gebildeten Dilactate des Caseins in einer Kochsalzlösung. In diesen Fällen gaben die Verfasser als unmittelbare Ursache der oben erwähnten Fehler den Mangel an Calciumsalzen an, die in zu geringer Menge vorhanden waren, als daß sie eine Neutralisation der sich bildenden Milchsäure hätten bewirken können.

Meist wurde nur die Rolle eines jeden Faktors getrennt untersucht, und nur eine einzige dieser Arbeiten [*van Dam* (7)] behandelt mehr das Zusammenwirken aller Faktoren. Wenn auch der Autor in dieser Abhandlung wertvolle Angaben über die Rolle und Bedeutung der Milchsäure und des Salzes bei der Reifung der Käsemasse gibt, so vertritt er doch gleichzeitig den Standpunkt, daß das Chymosin und das Pepsin identisch sind, und schließt somit das Labferment aus der Zahl der spezifischen Agenzien bei der Reifung der Käsemasse aus. Was die Milchsäure anbetrifft, so ist sie nach seiner Meinung von untergeordneter Bedeutung, denn die Wasserstoffionenkonzentration im Käse ist bereits nach den ersten 3 bis 4 Tagen konstant. Andererseits stimuliert die Milchsäure bis zu einem gewissen Grade die proteolytische Wirkung des zugefügten Labferments.

Die letzte Arbeit über die Untersuchung der Reifung des russischen Backsteinkäses, die in den bakteriologischen und biochemischen Versuchsstationen des milchwirtschaftlichen Instituts zu Wologda (8) unternommen wurde, gibt eine genügend klare Vorstellung über die Entwicklung des mikrobiologischen Prozesses und die chemische Veränderung der Bestandteile des Käses, jedoch keine theoretisch-wissenschaftliche Erklärung einer ganzen Reihe von Fragen, sowohl chemischen als auch bakteriologischen Charakters. Diese Mitteilung berührt gar nicht die proteolytische Tätigkeit der Milchsäurebakterien (Streptokokken und Stäbchen) im Käse, sowie die Bedeutung des Käselabferments des Salzes und der Milchsäure, die stets im Käse vorhanden sind.

Wie bereits oben erwähnt, existieren zahlreiche Arbeiten über die hier angeschnittenen Fragen, allein diese tragen einen außerordentlich zufälligen Charakter, daher haben wir beschlossen, eine systematische

Untersuchung derjenigen Erscheinungen vorzunehmen, die im Käse während seiner Reifung auftreten. Unsere Arbeit ist nach folgendem Plane aufgebaut: 1. Untersuchung der chemischen Faktoren, die an der Reifung der Käse beteiligt sind, 2. die Rolle der Mikroorganismen (hauptsächlich der Milchsäurestäbchen und -streptokokken). 3. Da es unsere Absicht war, die ersten beiden Versuchsserien unter Verwendung von Milch in kleinem Maßstab durchzuführen, so sollten die erreichten Ergebnisse auf Versuchskäsen nachgeprüft werden. Gegenwärtig ist die erste Serie der Versuche beendet.

Bereits die provisorischen Versuche in Probiergläsern haben in zwei Fällen das Vorhandensein eines scharfen proteolytischen Prozesses, nämlich die Zerlegung des Eiweißstoffes der Milch, dargetan, und zwar: bei Vorhandensein von Milchsäure und Käselab und bei Anwesenheit von Milchsäuremikroben und Käselab. In einem Falle, wo die Milch in einem klar gesäuerten Stadium der Milchsäuregärung verwandt wurde, war die Übersichtlichkeit dieses Prozesses augenscheinlich, sogar ohne Anwendung der chemischen Analyse, da das ganze Casein der Milch nach 24 Stunden gelöst war. Gleichzeitig wurden während der Ausführung der oben erwähnten Untersuchung über die Reifung des russischen Backsteinkäses Versuche mit Milchagar angestellt, auf den Milchsäure, Kochsalz und Labferment aufgetragen und Milchsäuremikroben aufgepflanzt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in einer besonderen Mitteilung geschildert worden. [Über die Anwendung des Milchagars von *Freudenreich* bei der Untersuchung der Milchsäuremikroben (9).] An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß unter gewissen Umständen sowohl die Milchsäuremikroben als auch die untersuchten Faktoren eine Klärung, folglich eine Auflösung des Caseins auf dem erwähnten Milchagar hervorriefen.

Diese zufälligen Beobachtungen mußten einer Prüfung unterzogen und dabei die chemischen Veränderungen genau in Betracht gezogen werden, denen die Bestandteile der Milch bei dem Prozeß der Reifung der Käse unterliegen.

Zuerst mußte ein orientierender Versuch angestellt werden, um die Frage zu klären, unter welchen Bedingungen weitere Beobachtungen am besten ausgeführt werden können. Dieser Vorversuch wurde in sterilem Medium angesetzt, aber trotz peinlichster Reinlichkeit ließ sich in einigen Probiergläsern eine Infektion nicht vermeiden.

Bei diesen Versuchen wurde Käselabferment, das durch ein Chamberlainfilter filtriert worden war, angewandt, daher blieben die Kolben steril. Die Filtration der Labfermentlösung durch ein Chamberlainfilter oder eine Berkefeldkerze befreit die Lösung zwar von Mikroorganismen, aber gleichzeitig wird dabei doch ihre Kraft geschwächt. Diese Schwächung des Ferments war so wechselnd (je nach

der Dauer des Filtrierens, der Konzentration der Lösung, der Qualität des Filters usw.), daß die weitere Anwendung einer filtrierten Lösung des Labferments keine vergleichbaren Resultate ergeben haben würde. Daher wurde bei den späteren Versuchen, an Stelle der Anwendung aller Bedingungen zur Wahrung der Sterilität, zum Schutz der Kolben vor Fäulnis 1 ccm Toluol auf 100 ccm Milch hinzugefügt. Wie die bakteriologischen Prüfungen, die mit allen Versuchskolben angestellt wurden, ergeben haben, hat dieser Zusatz von Toluol die Lebenskraft der Mikroorganismen vollkommen vernichtet, falls der Kolbeninhalt täglich durchgeschüttelt wurde.

Für alle Versuche wurde ein und dasselbe Präparat, Labferment, angewandt, das vorher auf das Vorhandensein von Pepsin geprüft wurde. Aus vielen Präparaten wurde eines ausgewählt, das kein Hühnereiweiß in Mettröhrchen verdaute, sogar nicht bei einer Konzentration des Ferments von 5 Proz. und mit verschiedenen Quantitäten von Milch- und Salzsäure. Das auf diese Weise geprüfte Präparat des Labferments wurde für die Versuche in physiologischer Kochsalzlösung von 1 g zu 100, d. h. 1 Proz. benutzt. Die gerinnende Kraft des von uns gebrauchten Präparats betrug 1 pro 100000. Es versteht sich von selbst, daß sowohl bei den orientierenden als auch bei den weiteren Versuchen nach Möglichkeit die Bedingungen der Sterilität erfüllt wurden, d. h. sterile Gefäße, sterilisiertes Kochsalz usw. verwandt wurden.

Die Versuchskolben wurden in der ganzen Versuchsserie im Laufe von 14 Tagen einer Temperatur von 25° C unterworfen. Die Versuche wurden möglichst gleichförmig ausgeführt, sowohl in bezug auf die Versuche selbst, als auch auf die nachfolgende chemische Analyse, so daß die erhaltenen Resultate durchaus vergleichbar sind. Für die Bestimmung des löslichen Stickstoffs in der Kontrollmilch wurde das Casein mit 1 ccm 80 proz. Milchsäure niedergeschlagen, denn die Anwendung von Essigsäure konnte eine Differenz mit dem Versuchskolben ergeben. Da die sterilisierte Milch langsam durch die Einwirkung des Labferments gerinnt, so wurden zu dieser Milch je zwei Tropfen einer 50 proz. Lösung von Calciumchlorid auf 100 ccm Milch zugesetzt. Die Ergebnisse des orientierenden Versuchs sind in Tabelle I angegeben.

In allen Kolben dieses Versuchs befanden sich 100 ccm sterilisierter Milch mit einem entsprechenden Zusatz von Reagenzien. In jedem Kolben wurden nach sorgfältiger Vermischung mit den Reagenzien bestimmt: Der Säuregrad in Thörnergraden, sowohl der Milch als auch der Molken, der Prozentgehalt des löslichen Stickstoffs in den Molken. Nach 2 Wochen wurden diese Größen nochmals bestimmt. Die Kolben Nr. 1, 2 und 3 enthielten nur Milchsäure in steigenden

Tabelle I.

Nr.	100 ccm Milch +	Säuregrad der Milch 12. X.	Säuregrad der Milch 26. X.	Säuregrad der Milch Differenz	Säuregrad der Molken 12. X.	Säuregrad der Molken 26. X.	Säuregrad der Molken Differenz	Proz. N in den Molken 12. X.	Proz. N in den Molken 26. X.	Proz. N in den Molken Differenz
1	0,5 ccm Milchsäure	77,2	81,5	+ 4,3	48,0	50,0	+ 2,0	0,093	0,090	— 0,003
2	2,0 „ „	195,0	213,0	+ 18,0	152,0	156,0	+ 4,0	0,096	0,084	— 0,012
3	4,0 „ „	355,0	395,0	+ 40,0	330,0	342,0	+ 12,0	0,103	0,096	— 0,007
4	1,0 ccm Labferment	25,0	—	—	—	—	—	0,116	0,128	+ 0,012
5	2,0 „ „	25,0	—	—	—	—	—	0,116	0,162	+ 0,044
6	4,0 „ „	25,0	—	—	—	—	—	0,120	0,181	+ 0,061
7	0,5 „ Milchsäure 1,0 „ Labferment	67,0	78,0	+ 11,0	46,0	59,0	+ 13,0	0,105	0,206	+ 0,101
8	2,0 „ Milchsäure 1,0 „ Labferment	184,0	203,0	+ 19,0	150,0	162,0	+ 12,0	0,105	0,199	+ 0,094
9	4,0 „ Milchsäure 1,0 „ Labferment	515,0	557,0	+ 42,0	480,0	535,0	+ 55,0	0,111	0,196	+ 0,085
10	2,0 „ Milchsäure 1,0 „ Labferment	197,0	214,0	+ 17,0	158,0	180,0	+ 22,0	0,116	0,214	+ 0,098
11	2,0 „ Milchsäure 2,0 „ Labferment	189,0	202,0	+ 13,0	154,0	173,0	+ 19,0	0,118	0,242	+ 0,124
12	2,0 „ Milchsäure 4,0 „ Labferment	270,0	288,0	+ 18,0	234,0	258,0	+ 24,0	0,124	0,286	+ 0,162
13	1,0 „ Labferment 9* Rasse	27,0	105,0	+ 78,0	—	—	—	0,084	0,205	+ 0,121
14	9* Rasse	27,0	103,0	+ 76,0	—	—	—	0,084	0,210	+ 0,126
15	9* Rasse	25,0	95,0	+ 70,0	—	—	—	0,084	0,126	+ 0,042
16	9* „ 8 Monat alt	—	114,0	—	—	—	—	—	0,131	—
17 18 19	Mit 1, 3 und 5 g Kochsalz					V e r f a u l t				
20	Kontrollmilch	23,0	26,0	+ 3,0	—	—	—	0,084	0,087	+ 0,003

Mengen, Nr. 4, 5 und 6 nur Käselabferment, auch in wachsenden Mengen, Nr. 7, 8 und 9 eine gleiche Quantität Käselabferment bei wachsenden Mengen Milchsäure, Nr. 10, 11 und 12 eine gleiche Quantität Milchsäure bei wechselnden Mengen Käselabferment, Nr. 13 und 14 Käselabferment und Milchsäurestreptokokken Rasse 9*, Nr. 15 nur Rasse 9*, Nr. 16 dieselbe Rasse, aber 8 Monate alt, Nr. 17, 18 und 19 Kochsalz in wachsenden Mengen und Nr. 20 die Kontrollmilch. Die Kolben mit Kochsalz sind, wie aus den Angaben der Tabelle I ersichtlich ist, verfault.

Die Milch erhöht bei Aufbewahrung mit Milchsäure ihren Säuregehalt bei gleichzeitiger Unveränderlichkeit des löslichen Stickstoffs in den Molken. Dieses Ansteigen des Säuregehaltes geht parallel mit der Erhöhung der zugesetzten Milchsäuremenge. Die Vergrößerung des Säuregehaltes der Molken ist bedeutend niedriger als bei Milch. Das Käselabferment allein steigert die Menge des löslichen Stickstoffs auch proportional der zugesetzten Fermentmenge.

Die Milchsäure, die gleichzeitig mit dem Labferment zugefügt wird, erhöht stark dessen proteolytische Tätigkeit, wobei, wie die Analysenergebnisse der Kolben Nr. 10, 11 und 12 gezeigt haben, diese Vergrößerung von der Menge des Käselabferments abhängt. Die Erhöhung der Acidität der Milch bei gleichzeitigem Vorhandensein von Milchsäure und Käselabferment hängt nur von der Menge der Säure ab. Der Säuregehalt der Molken steigt in diesem Falle bedeutend mehr als bei Milchsäure allein; dies kann dadurch erklärt werden, daß hier gleichzeitig die Menge des in den Molken gelösten Stickstoffs ansteigt, auf dessen Kosten sich die Acidität entsprechend erhöhen muß.

Die Kolben mit dem Kochsalz haben keinerlei Resultate ergeben, da dieselben mit Bakterien infiziert wurden.

Die Kontrollmilch hat sich fast gar nicht geändert.

Bei Prüfung der Analysenresultate der Kolben Nr. 15 und 16 ist ein Zunehmen der Menge des löslichen Stickstoffs in den Molken durch die Lebenstätigkeit der Milchsäuremikroben zu beobachten. Dieses Ansteigen geht sehr schnell vor sich, da zweiwöchige Kulturen fast den gleichen Prozentgehalt an löslichem Stickstoff in den Molken ergeben haben wie achtmonatige. Die gleichzeitige Anwesenheit von Käselabferment in der Milch, die von Milchsäuremikroben infiziert wurde, erhöht die Proteolyse des Eiweißstoffes bedeutend.

Da die spezielle Ausarbeitung dieser Frage im zweiten Teile dieser Arbeit vorgenommen werden wird, muß hier bemerkt werden, daß der Milchsäurestreptokokkus eine Proteolyse des Eiweißstoffes der Milch bewirkt, d. h. die wachsende Menge des löslichen Stickstoffs in den Molken kann nicht durch die gebildete Milchsäure hervorgerufen werden, wie dies durch die ersten drei Versuchskolben bestätigt wird. Diese

Tabelle

Nr.	100 ccm Milch +	Sterilisierte Milch						
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N
		12. XI.	25. XI.	Differenz	12. XI.	25. XI.	Differenz	12. XI.
1	1,0 g Kochsalz . .	26,5	24,2	— 2,3	—	—	—	0,086
2	3,0 g „ . .	27,0	24,9	— 2,1	—	—	—	0,084
3	5,0 g „ . .	28,0	24,4	— 3,6	—	—	—	0,079
4	0,5 ccm Milchsäure	92,4	95,0	+ 2,6	65,0	68,0	+ 3,0	0,085
5	2,0 „ „	266,0	271,5	+ 5,5	228,0	241,0	+13,0	0,096
6	4,0 „ „	490,2	511,1	+20,2	464,0	490,0	+26,0	0,105
7	1,0 „ Labferment	26,0	25,5	— 0,5	11,0	17,0	+ 6,0	0,128
8	2,0 „ „	26,0	24,3	— 1,7	11,0	15,5	+ 4,5	0,141
9	4,0 „ „	26,0	23,3	— 2,7	11,0	18,0	+ 7,0	0,144
10	{9* Rasse 1,0 ccm Labferment}	26,0	113,7	+87,7	11,0	87,0	+76,0	0,091
11	{9* Rasse 2,0 ccm Labferment}	26,0	110,7	+84,7	11,0	94,0	+83,0	0,091
12	{9* Rasse 4,0 ccm Labferment}	26,0	107,3	+81,3	11,0	96,0	+85,0	0,091
13	9* Rasse	26,0	110,9	+84,9	11,0	78,0	+67,0	0,091
14	{9* Rasse 5,0 g Kochsalz} . .	28,0	61,4	+33,4	—	—	—	0,079
15	Kontrolle	26,0	26,1	+ 0,1	—	—	—	0,091

proteolytische Wirksamkeit des Streptokokkus ist um so interessanter, als sie ohne Zusatz von Kreide auftritt.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß bei dem Sterilisieren der Milch das Eiweiß stark denaturiert wird und dadurch Bedingungen geschaffen werden, die ganz anormal im Vergleich zu denen der Käsemasse sind, wurde der folgende Versuch, der zum Teil eine Wiederholung des ersten darstellte, gleichzeitig mit roher und sterilisierter Milch ausgeführt.

Der Unterschied zwischen beiden Versuchen bestand darin, daß im ganzen nur drei Faktoren ausgewählt wurden, nämlich Milchsäure, Kochsalz und Käselab, nur getrennt, und daß dem Kolben Nr. 14 Rasse 9* und 5 g Kochsalz hinzugefügt wurden.

Zu allen Kolben dieses Versuchs wurde als Antiseptikum Toluol zugesetzt, natürlich mit Ausnahme der Kolben mit den Milchsäuremikroben.

Die Kolben Nr. 10, 11 und 12 enthielten Rasse 9 und eine wachsende Menge Käselabferment.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchs geht hervor, daß die sterilisierte und die rohe Milch dieselben qualitativen Resultate zeitigen, die Differenz ist nur quantitativer Art, wobei meist die Menge des löslichen Stickstoffs in der rohen Milch größer ist als in der sterilisierten. Das

II.

…n den Molken		Nicht sterilisierte Milch								
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N in den Molken		
25. XI.	Differenz	12. XI.	25. XI.	Differ.	12. XI.	25. XI.	Differ.	12. XI.	25. XI.	Differenz
0,081	— 0,005	17,5	19,5	+ 2,0	—	—	—	0,141	0,149	+ 0,008
0,079	— 0,005	19,1	20,3	+ 1,2	—	—	—	0,143	0,148	+ 0,005
0,070	— 0,009	20,0	18,9	— 1,1	—	—	—	0,144	0,150	+ 0,006
0,079	— 0,006	81,0	83,5	+ 2,5	66,0	66,0	± 0,0	0,150	0,141	— 0,009
0,088	— 0,008	237,8	249,2	+ 11,4	217,0	221,0	+ 4,0	0,167	0,161	— 0,006
0,097	— 0,008	434,5	455,0	+ 20,5	421,0	430,0	+ 9,0	0,194	0,179	— 0,015
0,170	+ 0,042	17,0	16,0	— 1,0	12,0	16,0	+ 4,0	0,167	0,232	+ 0,065
0,187	+ 0,046	17,0	19,9	+ 2,9	12,0	16,0	+ 4,0	0,176	0,250	+ 0,074
0,198	+ 0,054	17,0	20,2	+ 3,2	12,0	17,0	+ 5,0	0,180	0,270	+ 0,090
0,197	+ 0,106	17,0	68,9	+ 51,9	12,0	75,0	+ 63,0	0,149	0,217	+ 0,068
0,232	+ 0,141	17,0	74,5	+ 57,5	12,0	81,0	+ 69,0	0,149	0,276	+ 0,127
0,297	+ 0,206	17,0	76,2	+ 59,2	12,0	80,0	+ 68,0	0,149	0,306	+ 0,157
0,148	+ 0,057	—	—	—	12,0	70,0	+ 58,0	0,149	0,220	+ 0,071
0,099	+ 0,020	20,0	81,9	+ 61,9	15,0	63,0	+ 48,0	0,144	0,200	+ 0,056
0,092	+ 0,001	17,0	17,7	+ 0,7	—	—	—	0,149	0,196	+ 0,047

Kochsalz hemmt, wenn man nach den Resultaten der Kolben mit Rasse 9* und Kochsalz, sowie ohne dieses und mit der rohen Kontrollmilch urteilt, stark die Wirksamkeit der Fermente.

Die weiteren drei Versuchsserien wurden folgendermaßen ausgeführt: In jeder Serie wird ein Faktor allein untersucht in wachsenden Mengen und auch im Zusammenhang mit anderen Faktoren, die in unveränderlichen Mengen zugesetzt werden (Tabelle II).

Auf diese Weise läßt sich in den drei Serien das gleichzeitige Zusammenwirken aller drei Faktoren in verschiedenen quantitativen Verhältnissen beurteilen. Diese Versuche wurden sowohl mit roher als auch mit sterilisierter Milch ausgeführt.

Die erste Reihe der Versuche, deren Resultate in Tabelle III ausgeführt sind, erstreckte sich auf die Untersuchung der Wirkung der Milchsäure.

Zu 100 ccm Milch wurden 1, 2 und 4 ccm 70proz. Milchsäure zugesetzt. In die folgenden Kolben mit demselben Säuregehalt wurden noch hinzugesetzt: Käselab (2 ccm 1proz. Lösung), Kochsalz (3 g) und endlich beides zusammen.

Die Resultate haben die ersten Beobachtungen bestätigt, und zwar: die Milch erhöht bei Aufbewahrung mit Milchsäure ihre Acidität, ohne daß sich dabei die Menge des löslichen Stickstoffs in den Molken

Tabelle

Nr.	100 ccm Milch +	Sterilisierte Milch: Säuregrad der Milch 4. XII.	18. XII.	Differenz	Säuregrad der Molken 4. XII.	18. XII.	Differenz	Proz. N 4. XII.
1	1,0 ccm Milchsäure	108,0	111,0	+ 3,0	68,0	73,0	+ 5,0	0,091
2	2,0 „ „	188,0	196,0	+ 8,0	150,0	158,0	+ 8,0	0,093
3	4,0 „ „	350,0	379,0	+29,0	320,0	338,0	+18,0	0,093
4	1,0 ccm Milchsäure 2,0 „ Labferment	102,0	115,0	+13,0	68,0	82,0	+14,0	0,097
5	2,0 „ Milchsäure 2,0 „ Labferment	186,0	202,0	+16,0	148,0	167,0	+19,0	0,117
6	4,0 „ Milchsäure 2,0 „ Labferment	346,0	382,0	+36,0	315,0	348,0	+33,0	0,124
7	1,0 „ Milchsäure 3,0 g Kochsalz	99,0	102,0	+ 3,0	63,0	66,0	+ 3,0	0,079
8	2,0 ccm Milchsäure 3,0 g Kochsalz	187,0	196,0	+ 9,0	143,0	154,0	+11,0	0,064
9	4,0 ccm Milchsäure 3,0 g Kochsalz	351,0	380,0	+29,0	305,0	333,0	+28,0	0,061
10	1,0 ccm Milchsäure 2,0 „ Labferment 3,0 g Kochsalz	100,0	112,0	+12,0	65,0	82,0	+17,0	0,096
11	2,0 ccm Milchsäure 2,0 „ Labferment 3,0 g Kochsalz	175,0	202,0	+27,0	142,0	165,0	+23,0	0,085
12	4,0 ccm Milchsäure 2,0 „ Labferment 3,0 g Kochsalz	347,0	376,0	+29,0	306,0	338,0	+32,0	0,079
13	Kontrolle	22,0	24,0	+ 2,0	—	—	—	0,088

ändert. Es kann sogar eher von einem Absinken desselben gesprochen werden, denn in allen Versuchen wurde beobachtet, daß eine solche, wenn auch unbedeutende, Verringerung stattfand.

Das Käselabferment erhöht bei Anwesenheit von Milchsäure stark den Gehalt an löslichem Stickstoff, wobei große Mengen des letzteren eine ungünstige Wirkung aufweisen.

Das Kochsalz wirkt auf die Tätigkeit des Labferments ein, indem es, wie oben gesagt, hemmt, wie aus den Analysen der Kolben Nr. 10, 11 und 12 folgt.

In der Tabelle IV sind die Ergebnisse der Versuche mit Käselabferment wiedergegeben; der Versuch ist wie der vorige durchgeführt, d. h. zu der Milch sind wachsende Mengen Käselabferment allein und mit unveränderlichen Mengen Milchsäure und Kochsalz zugefügt. Aus den Angaben dieser Tabelle ist ersichtlich, was auch bereits bei den vorhergehenden Versuchen bemerkt wurde, nämlich daß die Milch bei Aufbewahrung mit Labferment eine proteolytische Zersetzung erleidet. Das ist aus der Vermehrung des Stickstoffgehaltes in den

II.

		Nicht sterilisierte Milch								
den Molken		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N in den Molken		
8. XII.	Differenz	4. XII.	18. XII.	Differ.	4. XII.	18. XII.	Differ.	4. XII.	18. XII.	Differenz
0,075	—0,016	114,0	118,5	+ 4,5	80,1	88,0	+ 7,9	0,149	0,145	—0,004
0,076	—0,017	187,5	196,5	+ 9,0	151,0	166,0	+15,0	0,144	0,140	—0,004
0,089	—0,004	338,5	367,0	+28,5	306,0	330,0	+24,0	0,140	0,138	—0,002
0,257	+ 0,160	113,0	119,0	+ 6,0	79,0	98,0	+19,0	0,143	0,293	+ 0,150
0,217	+ 0,100	175,0	194,0	+19,0	147,0	170,0	+23,0	0,148	0,238	+ 0,098
0,191	+ 0,067	318,0	348,0	+30,0	297,0	332,0	+35,0	0,161	0,229	+ 0,068
0,077	—0,002	116,0	120,5	+ 4,5	77,0	85,0	+ 8,0	0,118	0,132	+ 0,014
0,067	+ 0,003	174,0	184,5	+10,5	136,0	148,0	+12,0	0,114	0,127	+ 0,013
0,061	± 0,0	336,0	363,5	+26,5	309,0	332,0	+23,0	0,094	0,108	+ 0,014
0,203	+ 0,107	116,0	124,0	+ 8,0	79,0	98,0	+19,0	0,126	0,298	+ 0,172
0,177	+ 0,092	176,0	197,0	+21,0	142,0	169,0	+27,0	0,114	0,220	+ 0,106
0,146	+ 0,067	326,0	358,0	+32,0	298,0	333,0	+35,0	0,102	0,200	+ 0,098
0,098	+ 0,010	19,0	33,0	+14,0	—	—	—	0,142	0,184	+ 0,042

Molken ersichtlich. Diese Erhöhung des löslichen Stickstoffs ist in der rohen Milch bedeutend stärker als in der sterilisierten. Die Milchsäure steigert die Wirksamkeit des Käselabferments, aber nur, wenn diese in bestimmten Mengen zugesetzt wird. Das Kochsalz dagegen hemmt, denn die Milch mit Zusatz von Salz enthält in den Molken weniger gelösten Stickstoff als mit Labferment allein. Diese Verringerung der löslichen Stickstoffmenge bei Einwirkung von Kochsalz wird auch dann beobachtet, wenn alle drei Faktoren zugegen sind.

Die Wirkung des Kochsalzes zeigt sich noch übersichtlicher aus den Angaben der Tabelle V, in welcher die Resultate der Versuche mit Kochsalz ausgeführt sind. Dieser Ansatz entspricht im Prinzip dem vorhergehenden. Hier ist nicht nur die hemmende Wirkung des Kochsalzes klar zu ersehen, sondern auch die Abhängigkeit der Menge des löslichen Stickstoffs in den Molken von der Menge des zugesetzten Kochsalzes. Bei Durchsicht der Analysenresultate der Kolben Nr. 1, 2, 3 und 13 ergibt sich, daß das Salz auch auf die Fermente einwirkt, die in der nicht sterilisierten Milch enthalten sind.

Tabell

Nr.	100 ccm Milch +	Sterilisierte Milch						
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz.
		31. I.	12. II.	Differenz	31. I.	12. II.	Differenz	31. I.
1	1,0 ccm Labferment	29,0	28,5	— 0,5	15,0	17,0	+ 2,0	0,078
2	2,0 „ „	28,0	29,0	+ 1,0	16,0	18,0	+ 2,0	0,084
3	4,0 „ „	28,0	28,5	+ 0,5	16,0	17,0	+ 1,0	0,084
4	1,0 ccm Labferment, 1,0 „ Milchsäure	122,0	129,5	+ 7,5	88,0	98,0	+ 10,0	0,070
5	2,0 „ Labferment, 1,0 „ Milchsäure	121,0	127,5	+ 6,5	86,0	98,0	+ 12,0	0,076
6	4,0 „ Labferment, 1,0 „ Milchsäure	117,0	124,5	+ 7,5	82,0	100,0	+ 18,0	0,091
7	1,0 „ Labferment, 3,0 g Kochsalz	30,0	31,0	+ 1,0	16,0	16,0	± 0,0	0,096
8	2,0 ccm Labferment, 3,0 g Kochsalz	30,0	29,0	— 1,0	16.0	17,0	+ 1,0	0,095
9	4,0 ccm Labferment, 3,0 g Kochsalz	30,0	30,5	+ 0,5	16,0	17,5	+ 1,5	0,090
10	1,0 ccm Labferment, 1,0 „ Milchsäure, 3,0 g Kochsalz	118,0	124,0	+ 6,0	80,0	90,0	+ 10,0	0,067
11	2,0 ccm Labferment, 1,0 „ Milchsäure, 3,0 g Kochsalz	117,0	125,0	+ 8,0	82,0	91,0	+ 9,0	0,070
12	4,0 ccm Labferment, 1,0 „ Milchsäure, 3,0 g Kochsalz	114,0	122,5	+ 8,5	80,0	95,0	+ 15,0	0,080
13	Kontrolle	29,0	30,0	+ 1,0	—	—	—	0,078

Außerdem hat der Zusatz von Kochsalz bei diesen Versuchen auch eine Einwirkung auf die Dauer des Gerinnens der Milch durch das Labferment, indem der Zeitpunkt der Gerinnung herausgeschoben wird; ferner muß für die Ausscheidung von Casein aus der salzhaltigen Milch mehr Milchsäure zugesetzt werden.

In den Kolben, die nicht sterilisierte Milch mit Zusatz von Käselabferment und Kochsalz enthielten, bildeten sich, trotz täglichen Schüttelns, feste kleine Käse, die um so fester waren, je mehr Labferment hinzugefügt worden war.

Aus den Resultaten aller Versuche geht klar hervor, daß alle diese drei Faktoren die eine oder die andere Wirkung auf den Eiweißstoff der Milch ausüben; inwieweit sie dieselbe Wirkung auf die Bestandteile der Käsemasse ausüben, wird durch die letzte Reihe der Versuche gezeigt werden.

Bisher glaubte man, daß die Milchsäure in der Käsemasse nur eine Bedeutung als Regulator der Mikroflora des Käses hat, indem sie

IV.

… in den Molken		Nicht sterilisierte Milch								
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N in den Molken		
12. II.	Differenz	31. I.	12. II.	Differ.	31. I.	12. II.	Differ.	31. I.	12. II.	Differenz
0,100	+ 0,022	24,0	26,0	+ 2,0	12,0	17,0	+ 5,0	0,149	0,226	+ 0,077
0,118	+ 0,034	24,0	26,0	+ 2,0	12,0	17,0	+ 5,0	0,141	0,231	+ 0,090
0,135	+ 0,051	24,0	27,5	+ 3,5	12,0	17,0	+ 5,0	0,140	0,240	+ 0,100
0,189	+ 0,119	114,0	116,5	+ 2,5	81,0	93,0	+ 12,0	0,155	0,217	+ 0,062
0,209	+ 0,133	111,0	120,0	+ 9,0	82,0	98,0	+ 16,0	0,143	0,245	+ 0,102
0,234	+ 0,143	108,0	115,5	+ 7,5	80,0	98,0	+ 18,0	0,140	0,280	+ 0,140
0,095	— 0,001	25,0	25,0	± 0,0	16,0	16,0	± 0,0	0,175	0,155	— 0,020
0,100	+ 0,005	25,0	25,5	+ 0,5	16,0	16,0	± 0,0	0,164	0,155	— 0,009
0,105	+ 0,015	25,0	25,5	+ 0,5	16,0	16,0	± 0,0	0,158	0,155	— 0,003
0,135	+ 0,068	115,0	119,0	+ 4,0	82,0	92,0	+ 10,0	0,158	0,183	+ 0,025
0,166	+ 0,096	112,0	122,5	+ 10,5	80,0	94,0	+ 14,0	0,153	0,223	+ 0,070
0,185	+ 0,105	110,0	115,5	+ 5,5	78,0	94,0	+ 16,0	0,140	0,227	+ 0,087
0,081	+ 0,003	24,0	25,0	+ 1,0	—	—	—	0,158	0,206	+ 0,048

die Entwicklung vieler für den Käse schädlicher Mikroben verhindert. Jetzt kann man annehmen, daß die Milchsäure einerseits die Wirkung des Labferments steigert und andererseits bis zu einem gewissen Grade die Acidität erhöhen kann; dies kann dann von Bedeutung sein, wenn bereits der gesamte Zucker im Käse vergoren ist.

Dem Käselabferment muß man nicht nur eine koagulierende Bedeutung für die Milch zuschreiben, es nimmt, wie die Versuche erwiesen haben, trotz des gänzlichen Fehlens von Pepsin an der Auflösung des Eiweißstoffes der Milch teil, und zwar um so mehr, je mehr Ferment zugesetzt worden ist.

Die Wirkung wird noch durch den Zusatz der Milchsäure verstärkt, wenn diese selbst in solchen Mengen hinzugesetzt wird, von denen an die Wirkung des Pepsins beginnt abzunehmen.

Das Kochsalz ist nicht nur wichtig als Geschmacksstoff und Konservierungsmittel; es hemmt stark die Wirkung des Käselabferments sowie derjenigen Fermente, die sich in der frischen Milch befinden.

Tabelle

Nr.	100 ccm Milch +	Sterilisierte Milch						
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N
		15. II.	29. II.	Differenz	15. II.	29. II.	Differenz	15. II.
1	1,0 g Kochsalz . .	29,0	31,0	+ 2,0	—	—	—	0,066
2	3,0 g " . .	30,0	31,0	+ 1,0	—	—	—	0,070
3	5,0 g " . .	31,0	31,0	± 0,0	—	—	—	0,073
4	1,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment	31,0	34,0	+ 3,0	17,0	20,5	+ 3,5	0,136
5	3,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment	32,0	34,0	+ 2,0	18,0	20,0	+ 2,0	0,126
6	5,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment	33,0	34,0	+ 1,0	19,0	19,5	+ 0,5	0,121
7	1,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Milchsäure	202,0	214,0	+12,0	162,0	169,0	+ 7,0	0,050
8	3,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Milchsäure	205,0	215,0	+10,0	162,0	170,0	+ 8,0	0,055
9	5,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Milchsäure	202,5	211,0	+ 9,5	158,0	164,0	+ 6,0	0,058
10	1,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment, 2,0 " Milchsäure	201,0	214,0	+13,0	162,0	171,5	+ 9,5	0,064
11	3,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment, 2,0 " Milchsäure	200,0	213,0	+13,0	156,0	169,0	+13,0	0,058
12	5,0 g Kochsalz, 2,0 ccm Labferment, 2,0 " Milchsäure	199,0	209,0	+10,0	152,0	166,0	+ 14,0	0,056
13	Kontrolle	27,5	28,5	+ 1,0	—	—	—	0,067

Man kann mit großer Sicherheit annehmen, daß es in derselben Weise auf die Fermente einwirkt, die von den Mikroben im Käse ausgeschieden werden. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denjenigen *van Dams* überein, der dem Salze eine beschleunigende Wirkung zuschreibt. Überdies muß es als Lösungsmittel für die Eiweißstoffe im Käse seinen Zweck erfüllen. Die Untersuchung dieser Frage geht auf kolloidchemisches Gebiet über und ist bisher noch gar nicht ausgearbeitet worden.

Die erwähnten drei Faktoren nehmen also an dem Reifen der Käsemasse teil, und man muß ihnen eine Bedeutung zuerkennen, die nicht geringer ist als die der Mikroorganismen.

Ungeklärt bleibt bis jetzt die Frage nach den chemischen Veränderungen, die in der Milch bei Aufbewahrung mit Milchsäure vor sich gehen. Man kann annehmen, daß sich hier eine Zersetzung des Zuckers abspielt, aber die Bestimmung des Zuckers vor und nach Einwirkung der Milchsäure hat ergeben, daß dieser hierbei keiner Veränderung unterworfen wurde, wie aus Tabelle VI ersichtlich ist.

den Molken		Nicht sterilisierte Milch								
		Säuregrad der Milch			Säuregrad der Molken			Proz. N in den Molken		
29. II.	Differenz	15. II.	29. II.	Differ.	15. II.	29. II.	Differ.	15. II.	29. II.	Differenz
),066	± 0,0	23,0	28,0	+ 5,0	—	—	—	0,115	0,138	+ 0,023
),066	— 0,004	23,5	27,5	+ 4,0	—	—	—	0,115	0,221	+ 0,006
),063	— 0,010	24,0	27,5	+ 3,5	—	—	—	0,115	0,119	+ 0,004
),161	+ 0,025	23,0	27,0	+ 4,0	14,0	17,0	+ 3,0	0,160	0,203	+ 0,043
),138	+ 0,012	23,5	29,0	+ 5,5	15,0	17,0	+ 2,0	0,152	0,169	+ 0,017
0,129	+ 0,008	24,0	27,0	+ 3,0	16,0	16,0	± 0,0	0,149	0,160	+ 0,011
0,047	— 0,003	199,0	204,0	+ 5,0	162,0	172,0	+10,0	0,104	0,121	+ 0,017
0,053	— 0,002	194,0	201,5	+ 7,5	160,0	172,0	+12,0	0,095	0,110	+ 0,015
0,058	± 0,0	197,0	204,5	+ 7,5	156,0	163,0	+ 7,0	0,090	0,093	+ 0,003
0,109	+ 0,045	196,0	209,0	+13,0	162,0	179,0	+17,0	0,118	0,208	+ 0,090
0,100	+ 0,042	193,0	208,5	+15,5	156,0	175,0	+19,0	0,107	0,190	+ 0,083
0,093	+ 0,037	193,0	204,0	+11,0	154,0	170,0	+16,0	0,101	0,177	+ 0,076
0,070	+ 0,003	21,5	27,0	+ 5,5	—	—	—	0,124	0,164	+ 0,040

Vorliegende Daten beziehen sich auf die Milch, die im Laufe von 14 Tagen mit 4 ccm 70proz. Milchsäure aufbewahrt wurde. Der Zucker wurde polarimetrisch bestimmt. Da die Menge des löslichen Stickstoffs dabei nicht erhöht wurde, so kann man schwerlich an eine tiefgehende

Tabelle VI.

	Säuregehalt	Zucker
Anfangs	354,5°	3,91 Proz.
Nach 14 Tagen . . .	378,5	3,90 „

Spaltung der Eiweißstoffe der Milch unter der Einwirkung von Milchsäure denken. Die hier aufgetretene Erscheinung wird einer weiteren speziellen Ausarbeitung unterzogen, unabhängig von der vorliegenden Arbeit.

Die Vermehrung des in den Molken gelösten Stickstoffs unter der Einwirkung des Käselabferments kann entweder proteolytischen Charakters oder rein dispersoider Natur sein.

Tabelle VII.

100 ccm Milch +	Säuregehalt der Milch		Proz. lösliches N		Proz. zersetzl. N		Proz. Amm.-N	
	1. III.	14. III.	1. III.	14. III.	1. III.	14. III.	1. III.	14. III.
2 ccm Labferment .	24,0	25,0	0,065	0,113	0,036	0,064	0,004	0,005
2 „ „ 2 „ Milchsäure	194,0	205,5	0,066	0,130	0,032	0,057	0,004	0,005
2 „ Labferment 2 „ Milchsäure 3 g Kochsalz	201,0	214,0	0,048	0,096	0,030	0,039	0,004	0,006
Kontrolle	24,0	24,0	0,053	0,055	0,037	0,036	0,004	0,004

Nach den Angaben der Tabelle VII ist vorläufig kein Grund vorhanden, eine weitgehende Spaltung der Eiweißstoffe anzunehmen, obwohl eine Vermehrung des zerlegten (Ammoniak-) Stickstoffs stattgefunden hat. In dieser Tabelle sind die Mengen des löslichen, zerlegten und des Ammoniakstickstoffs angegeben, die in der Milch bei ihrer Aufbewahrung während 14 Tagen unter Zusatz der zu untersuchenden Stoffe vorgefunden wurden.

In den ersten zwei Versuchsserien wurden gleichzeitig Bestimmungen ausgeführt, die sich auf die Wirkung der Milchsäuremikroben auf Milch mit Zusatz von Salz und Käselab und ohne diese Zusätze beziehen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Milchsäurebakterien, speziell der Streptokokkus, über eine proteolytische Fähigkeit verfügen. Wie sich erwiesen hat, tritt diese Funktion in der ersten Lebensperiode auf, denn zweiwöchige Kulturen haben die gleiche Zunahme an löslichem Eiweißstoff ergeben wie achtmonatige. Man kann daher voraussetzen, daß die Proteolyse des Eiweißstoffes in direkter Verbindung mit dem Leben der Bakterienzelle steht, denn der zweiwöchige Termin fällt mit ihrer Lebensdauer zusammen. Es ist möglich, daß aus dem Körper der Mikrobenzellen dasjenige Ferment hier nicht ausgeschieden wird, nach dem die Mikrobiologen so eifrig bei der Gruppe der Milchsäurebakterien suchen, und das von vielen Forschern Casease genannt wird. Ferner ist es möglich, daß die Proteolyse hier mit den Funktionen des Lebewesens zusammenhängt. Wenn man dies auf die Bedingungen der Käsemasse bezieht, wo bei einer geringeren Menge Milchzucker die Produktion der Milchsäure alsbald eingestellt wird und die gebildete neutralisiert oder teilweise gespalten wird, so haben wir auch einen länger andauernden proteolytischen Vorgang infolge der größeren Lebensdauer der Mikroorganismen.

Für eine experimentelle Bestätigung der oben genannten Voraussetzung ist beabsichtigt, im zweiten Teile dieser Arbeit die Hauptlebensfunktionen der Milchsäurestreptokokken und -stäbchen bei ihrem Wachstum in der Milch, getrennt und zusammenwirkend, zu unter-

suchen, sowie die Wirkung der in der genannten Abhandlung erwähnten Faktoren auf dieselben.

Infolge des Unterschieds in den quantitativen Verhältnissen der Bestandteile in der Milch und in der Käsemasse wird beabsichtigt, alle diese Versuche nach Möglichkeit auf Versuchskäsen nachzuprüfen; diese versuchsweise Käsebereitung wird im Laboratoriumsmaßstab vorausgesetzt. Je nach den erhaltenen Resultaten wird es notwendig sein, einige Versuche auch in der Fabrikspraxis zu prüfen.

Literatur.

1) *C. Stephenson*, New Zeeland Dep. of agric. **14**, 32, 1917. — 2) *J. Zaykowsky*, Milchwirtsch. Institut zu Wologda 1925. — 3) *S. M. Babcock* und *H. L. Russel*, Centralbl. f. Bakt. **8**, 615, 1879; **6**, 17, 1900. — 4) *W. van Dam*, ebendaselbst **32**, 7, 1912. — 5) *F. W. J. Bockhout* und *J. J. Ott de Vries*, ebendaselbst **19**, 690, 1907; **24**, 122, 1909; **28**, 98, 1910. — 6) *S. M. Babcock* und *H. L. Russel*, A. R. of the Wiscousin Exp. St. 1901; Centralbl. f. Bakt. **9**, 757, 1902. — 7) *W. van Dam*, Centralbl. f. Bakt. **26**, 189, 1910. — 8) *G. Inichoff*, *C. Koroloff* und *A. Skorodumowa*, Milchwirtsch. Institut zu Wologda 1924. — 9) *N. Slobodska-Zaykowska*, diese Zeitschr. **159**, 216, 1925.

Über die Anwendung des Milchagars von Freudenreich bei der Untersuchung der Milchsäurebakterien.

Von

N. Slobodska-Zaykowska.

(Aus dem milchwirtschaftlichen Institut zu Wologda, Rußland.)

(Eingegangen am 8. März 1925.)

Um verflüssigende Bakterienformen aufzufinden, wandte *Freudenreich* (1) bei der Untersuchung der Emmentaler Käse einen Nährboden an, der aus Milch und Agar bestand. Zur Herstellung dieses Nährsubstrats benutzte er eine Mischung von 5 ccm sterilisierter Milch und 5 ccm 2 proz. Nähragar. Aus der Literatur geht hervor, daß dieser Nährboden, der zur Auffindung der proteolytischen Eigenschaften der Bakterien dient, die meisten Vorzüge besitzt. *Hastings* (2) bestätigt z. B., daß dieser Milchagar für den Nachweis der verflüssigenden Mikroorganismen im Vergleich zur Gelatine weit bessere Dienste leistet. Denn erstens kann er bei jeder Temperatur angewandt werden, zweitens erlaubt er die Beobachtung der Proteolyse des Caseins in kurzer Zeit und drittens ist er für die Feststellung der Enzyme aus tierischen und pflanzlichen Geweben geeignet. *Hastings* (3) zeigt in gleicher Weise, wie sich verschiedene Mikroben zum Milchagar verhalten. Ferner unternimmt er den Versuch, die chemischen Reaktionen, die sich bei der Anwendung dieses Nährbodens abspielen, zu erklären. Eine gleiche Untersuchung führte *Eikman* (4) aus, der den praktischen Wert des Milchagars darin sieht, daß die verflüssigenden Formen hier die Substanz nicht lösen und dadurch die Möglichkeit geben, die auflösende Wirkung der Mikroben, welche die Zerlegung des Caseins in verschiedener Weise bewirken, zu beobachten. Zu allermeist wurde der Milchagar bisher als Nährboden für die verflüssigenden Mikroben geschätzt. Man wollte ihn bei der Untersuchung der Mikroorganismen, die sich im Käse befinden, anwenden und schrieb ihm eine Rolle bei der Diagnostik der speziellen Fälle zu. Die Anwendung des Milchagars bei der Käseanalyse ergibt nicht immer das gleiche Resultat, was mit der Anwesenheit der

zufälligen Mikroflora im Zusammenhang steht. Um die Wirkungen der verschiedenen Mikroben, die sich im Käse befinden, quantitativ zu bestimmen, wird der Milchagar angewandt. Dieses hat seinen Grund in der Voraussetzung, daß die Milchsäurebakterien, welche die Eigenschaft besitzen, das Casein in einfachere Bestandteile zu zerlegen, diese Fähigkeit bei der Aussaat auf den Milchagar zur Geltung bringen. Wie gesagt, gibt die Aussaat der Käseemulsion (die bei der Käseanalyse gewöhnlich angewandt wird) manchmal ein sehr gutes Bild des aufgelösten Caseins; dabei haben wir in der Schale nur eine kleine Zahl von Kolonien, in deren Umgebung nicht die geringste Spur von Casein zurückbleibt. Wir beobachten dann eine durchsichtige Aureole, welche die Form eines Kreises hat, dessen Radius zwischen einigen Millimetern, 1 cm und mehr schwankt, im Verhältnis zum Alter der Kolonien. Ein derartiges Resultat erhält man in dem Falle, wenn sich im Käse eine stark verflüssigende Bakterienart befindet; meist trifft man dabei die sogenannten säurelabbildenden Kokken an.

Es ist dabei zu bemerken, daß diese Arten nur sporadisch angetroffen werden; für gewöhnlich gibt eine Aussaat von Käseemulsionen ein recht undeutliches Bild von den sich entwickelnden kleinen Kolonien, die sich kaum von ihrem Untergrund, dem Milchagar, abheben. Zuweilen kann rings um diese Kolonien ein Durchscheinen des Nährsubstrats wahrgenommen werden, das aber bald verschwindet und kein so klares Bild gibt wie die Horinikokken. Die ausführliche Analyse dieser Kolonien läßt keinen Zweifel darüber, daß Milchsäurebakterien vorhanden sind. Worin sich aber augenscheinlich die proteolytische Wirkung der Milchsäurebakterien zeigt, das ist die Frage, die bei den Versuchen mit Milchsäurebakterien auf Milchagar auftaucht. Die genaue Untersuchung des Wachstums dieser Bakteriengruppe im Nährsubstrat ergibt folgendes Resultat. Zur vollen Ausnutzung der Milchbestandteile ist es zweckmäßiger, den Wasseragar an Stelle des Nähragars zu gebrauchen. Der Wasseragar muß sogar 3 bis 4 Tage im fließenden Wasser mazeriert werden, um später mit der gleichen Quantität von Milch vermischt zu werden. Die Milch kann in beliebiger Art und Weise behandelt werden; der Wasseragar wird in 2 proz. Lösung genommen. Unter den angegebenen Bedingungen ist eine vollkommene Analogie des Wachstums der Milchsäurebakterien in diesem Nährboden mit dem Wachstum der Mikroben in der Milch festzustellen.

Die sorgfältige Untersuchung des Wachstums einer reinen Kultur des Streptokokkus auf einem derartigen Agar gibt uns die Möglichkeit zu beobachten, daß nach 12 bis 14 Stunden das Wachstum (punktiertes) der Kolonien beginnt, in deren Umgebung sich eine leichte Klärung des Nährbodens zeigt. Wenn man die Schale weiter stehenläßt, so sieht man, daß sich ihr Aussehen verändert. Die Oberfläche wird

glänzendweiß, wie man bemerken kann von den Kolonien ausgehend, indem die weiße Färbung die frühere Klärungszone verdunkelt. Mit der Zeit verschwinden diese hellen Flecke, und es beginnt die abermalige Klärung der Zone rings um die Kolonien; allein diese Klärung geht von der Peripherie der trübweißen Flecken aus.

Es entsteht nun die Frage, ob diese Klärung rings um die Kolonien – mag sie primär oder sekundär sein — der proteolytischen Aktivität der Mikroben zugeschrieben werden kann. Eine chemische Definition ist hier unmöglich; die Frage muß daher anders entschieden werden. Die Hauptfunktion der Milchsäurebakterien ist die Säurebildung; es ist infolgedessen zu ermitteln, wie unter denselben Bedingungen, d. h. in Petrischalen mit Milchagar, die Milchsäure auf die Milch einwirkt. Zu diesem Zwecke bringt man in eine Anzahl Petrischalen Milchagar und stellt eine Reihe von Milchsäurelösungen von 0,5 bis 40 Proz. Stärke her. Trägt man nun mittels einer Platinöse kleine Quantitäten dieser Lösungen auf isolierte Teile des Milchagars auf, so entsteht ein recht buntes Bild: dort, wo die schwachen Lösungen hingelangen, beginnt die Klärung fast augenblicklich; da, wo die Tropfen der starken Lösungen hingeraten sind, bildet sich sehr bald ein glänzendweißer Niederschlag von Casein, der sich um so besser abhebt und eine um so größere Fläche einnimmt, je konzentrierter die angewandte Säure war.

Allmählich verschwindet dieser Bodensatz und wird durch eine klare Zone ersetzt. Wird auf die durch die Säure abermals geklärte Fläche eine noch etwas konzentriertere Lösung aufgetragen, so trübt sich die Fläche wieder.

Wenn man sich jetzt des Bildes erinnert, das beim Wachstum der Milchsäurebakterien entsteht, so kann man behaupten, daß die in den ersten 24 Stunden erfolgende Lösung des Caseins von der Tätigkeit der Milchsäure abhängt. Die Quantität der Milchsäure wächst stufenweise an, und deshalb wird die durch die Wirkung der schwachen Säurelösungen eintretende Caseinauflösung durch das Casein ersetzt, das durch den Säureüberschuß ausgefällt wird. Alle diese Erscheinungen entstehen in dem kompakten Nährsubstrat; aber nach den Untersuchungen *Grahams* findet die Diffusion ebenso in den flüssigen wie in den gallertartigen Substraten statt, und deshalb ist kein Grund vorhanden, sie in diesem Falle zu verneinen. Es ist sehr schwer, den Übergang der Auflösungsphase in die Phase der Niederschlagsbildung zu erklären.

Meist nimmt man an, daß die Wirkung der schwachen und mittelstarken Säurelösungen auf die Milch darin besteht, daß das Casein ausgefällt wird. Die Calciummoleküle trennen sich von den Caseinteilen, und das Casein lagert sich ab. Die Caseinmoleküle verbinden sich mit einem oder mit mehreren Milchsäuremolekülen, was von der

Quantität der hinzugefügten Säure abhängt. Im ersten Falle bekommen wir ein Monolactat, im zweiten Di- oder Polylactate. Das Monolactat ist in den Lösungen neutraler Salze löslich; die anderen sind darin unlöslich. So läßt sich die Erscheinung der durchsichtigen Aureole erklären, die wir im ersten Augenblick der Entwicklung der Kolonie beobachten. In diesem Falle verursacht die kleine Quantität der durch Mikroben hervorgebrachten Säure die Bildung von Monolactat. Die weitere Vermehrung der Milchsäuremenge bewirkt dann den Übergang des Monolactats in das Caseindilactat und wird von der Bildung des glänzendweißen Niederschlags um die Kolonien herum begleitet. Die Diffusion der Milchsäure in die sie umgebende Nährsubstanz, die nachher erfolgt, ruft wieder die Klärung hervor.

Da bei Anwendung verschiedener Milchsäurekonzentrationen in Petrischalen ein ähnliches Bild entsteht wie bei der Entwicklung der Milchsäurebakterien unter denselben Bedingungen, kann man die Ansicht vertreten, daß das „Durchfressen" der Milchsäurebakterien nichts anderes darstellt als die Wirkung der sich bildenden Säure. Unter diesen Umständen ist es sehr schwierig, von einer Untersuchung der proteolytischen Eigenschaften der Käsestäbchenbakterien sowie der Milchsäurestreptokokken zu sprechen. Die Funktion der Säurebildung ist hier so stark entwickelt, daß es unmöglich ist, den enzymatischen Prozeß, auch wenn er ganz klar verläuft, aufzudecken. In der Literatur findet man erwähnt, daß das Labferment die proteolytischen Funktionen der Milchsäurebakterien erhöht, und man kann sich vorstellen, daß dieser Vorgang in den Petrischalen mit Milchagar bei Anwendung des Labferments zutage tritt. Um dieses Ziel zu erreichen, präpariert man die sogenannte „Labmilch", d. h. sterilisierte Milch mit Zusatz einiger Tropfen 1 proz. Lablösung. Diese Milch läßt man 3 bis 4 Stunden stehen und verwendet sie dann zur Bereitung des Milchagars. Das Wachstum der Kolonien sowie das Bild, das zu beobachten ist, unterscheidet sich nicht von dem vorhergehenden. Ein „Durchfressen" findet nicht statt. Mann kann also hier nicht von einer zweifellosen Proteolyse sprechen. Es geht daraus hervor, daß der Milchagar zum Nachweis der proteolytischen Eigenschaften der Milchsäurebakterien selbst bei Anwendung von Labmilch nicht dienen kann. Durch Hinzufügen von 3 bis 4 Proz. Kochsalz ändert sich das Bild des Wachstums dieser Mikroben. Beim Gebrauch eines solchen Agars mit Kochsalz hält sich die ursprüngliche Zone länger; der Grund liegt erstens in der langsamen Bildung der Säure und zweitens darin, daß die Ausscheidung der Dilactate durch das Natriumchlorid erschwert wird, weil die mit Salz behandelte Milch 1,5 mal mehr Milchsäure für das Fällen des Caseins erfordert. Das alles zeigt, daß von günstigen Bedingungen für die Untersuchung der Proteolyse, die unter dem

Einfluß der obengenannten Mikrobengruppe entsteht, keine Rede sein kann.

Vorliegende Untersuchungen haben ergeben, daß der *Freudenreich*sche Milchagar für die proteolytischen Enzymuntersuchungen der Käse sowie des Milchsäurestreptokokkus unbrauchbar ist. Ferner ist er zur Diagnose nicht anwendbar, da die hervorgerufenen Veränderungen sehr schwach ausgeprägt sind; besonders tritt dies bei der Aussaat mit anderen Mikroben zusammen in Erscheinung. Dieser Nährboden behält jedoch seine Bedeutung bei den Untersuchungen über die Proteolyse derjenigen Mikroben, bei denen diese Funktion an erster Stelle steht; sogar wenn die Proteolyse von einer Milchsäureproduktion begleitet wird, wird erstere doch nicht durch die letztere beeinträchtigt.

Zu derartigen Mikroben können wir die Mehrzahl der Säurelabkokken rechnen, die eine intensive Spaltung des Caseins hervorrufen und bis 60 Proz. Säuregehalt ergeben, wodurch wiederum die Proteolyse, die durch das Enzym hervorgerufen wird, verstärkt wird.

Literatur.

1) *Freudenreich*, Centralbl. f. Bakt. **1**, 169. — 2) *Hastings*, ebendaselbst **10**, 384. — 3) *Derselbe*, ebendaselbst **12**, 591. — 4) *Eikman*, ebendaselbst **10**, 531.

Über das Vorkommen von Di-hydroxy-chinolin-carbonsäure (β-Säure von U. Suzuki) in der Reiskleie.

Von

Yoshikazu Sahashi.

(Aus dem Suzuki-Biochemical Laboratory of the Institute of Physical and Chemical Research. Komagome, Hongo-ku, Tokyo.)

(Eingegangen am 10. März 1925.)

Im Jahre 1911 hat *U. Suzuki* eine antineuritische Substanz (Vitamin B) aus der Reiskleie isoliert, der er den Namen Oryzanin gab. Sein Rohoryzanin wurde aus dem alkoholischen Extrakt der Reiskleie durch Fällen mit Phosphorwolframsäure und durch Zerlegen des dadurch entstandenen Niederschlags mit Baryt in üblicher Weise dargestellt. Beim Kochen des Rohoryzanins mit verdünnter Säure hat er außer Cholin, Nikotinsäure, Traubenzucker und einer harzartigen Substanz zwei schwer lösliche Säuren isoliert. Sie wurden aus alkoholischer Lösung fraktioniert, kristallisiert und ihnen vorläufig die Namen α- bzw. β-Säure gegeben. Die beiden Substanzen waren einander sehr ähnlich; sie waren in Wasser schwer, in Alkohol und Alkalien aber leicht löslich; die alkoholische Lösung reagierte stark sauer. Sie gaben eine starke rotviolette Färbung mit alkalischer Diazobenzolsulfonsäure und ferner auch starke *Millon*sche Reaktion. Die Analyse der α-Säure stimmte mit der Formel $C_{18}H_{16}N_2O_9$ und die der β-Säure mit $C_{10}H_8NO_4$[1]).

Weitere Untersuchungen waren aber längere Zeit unterbrochen. Wird der alkoholische Extrakt der Reiskleie in 20proz. Alkohol gelöst und längere Zeit stehengelassen, so scheidet sich allmählich ein amorpher, brauner Niederschlag aus. *B. Suzuki* hat kürzlich diese Substanz sorgfältig gereinigt und gefunden, daß sie eine wachstumsbeschleunigende Wirkung auf Hefe hatte, obgleich sie gegen Tauben-Beriberi fast wirkungslos war. Er hat ferner diese Substanz mit verdünnter Salzsäure gekocht

[1]) Diese Zeitschr. 1912; Journ. Tokio Chem. Soc. 1910, 1911, 1912.

und β-Säure in reichlicher Menge erhalten. Diese β-Säure selbst erwies sich auf Hefewachstum schwach, aber deutlich wirksam[1]).

Der Verfasser hat unlängst eine größere Menge des oben genannten braunen Niederschlags als Ausgangsmaterial der β-Säure von der Firma Sankyo & Co. bekommen, wo das Oryzanin seit zehn Jahren fabrikmäßig dargestellt wird, und nach dem Vorschlag von Prof. *U. Suzuki* etwa 300 g β-Säure in reinem Zustande dargestellt, um die chemische Natur derselben weiter zu studieren.

Suzuki hatte früher für die β-Säure die empirische Formel $C_{10}H_8NO_4$ vorgeschlagen. Der Verfasser konnte jedoch dartun, daß diese Säure 1 Mol. Kristallwasser enthält, das beim Trocknen auf 100° nicht vollständig entfernt wird. Erst bei 150° wurde das Wasser vollständig ausgetrieben. Die Analyse des wasserfreien Präparats stimmte nun besser mit $C_{10}H_7NO_4$ überein. Ferner hat der Verfasser verschiedene Salze, Ester, ein Acetyl- und Benzoylderivat sowie die Bromverbindung der β-Säure dargestellt und konstatiert, daß sie zwei OH- und eine COOH-Gruppe in ihrem Molekül enthält. Bei der Einwirkung von starker Salpetersäure auf β-Säure wurden Juglonsäure nebst Oxalsäure gebildet.

Schließlich hat der Verfasser bei der Zinkstaubdestillation Chinolin erhalten und als charakteristisches Pikrat identifiziert, so daß die Existenz des Chinolinkerns außer Zweifel gestellt wurde. Auf Grund dieser Beobachtungen nimmt der Verfasser an, daß die β-Säure eine Dihydroxychinolincarbonsäure ist. Die relative Stelle der OH- und COOH-Gruppe in dem Molekül ist freilich noch nicht festgestellt, weil verschiedene Strukturisomere existenzfähig sind. Der Verfasser vermutet aber, daß der β-Säure vielleicht eine der folgenden Formeln zukommt:

COOH, HO, OH, N — oder — COOH, HO, OH., N

Die Bildung von Juglonsäure und Oxalsäure bei der Einwirkung von Salpetersäure auf die β-Säure ist in folgendem Schema zu verstehen:

COOH, HO, OH, N → COOH, HO, COOH, O_2N, NO_2 + (COOH | COOH)

β-Säure — Juglonsäure — Oxalsäure.

[1]) Journ. Chem. Soc. Jap. 1924.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung der β-Säure.

Der braune Niederschlag, der sich beim Stehen des alkoholischen Extrakts der Reiskleie allmählich zu Boden setzte, wurde mit Tuff koliert, wiederholt mit Wasser gewaschen und getrocknet. 200 g des so erhaltenen Pulvers wurden in einem großen Rundkolben mit 3 Liter 3proz. Salzsäure übergossen und unter Rückflußkühlung 2 Stunden gekocht. Am Anfang schied sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein braunes Öl ab, das sich später in eine schwarze, harzartige Masse verwandelte. Hierauf filtrierte man heiß ab und ließ das Filtrat erkalten. Es schieden sich bald gelbbraune Kristalle der β-Säure in reichlicher Menge aus, die abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurden. Zur Reinigung wurden sie in 90proz. Alkohol suspendiert und unter Zusatz von wenig Natronlauge vorsichtig erwärmt, bis sie klar gelöst wurden. Man setzte nun wenig Tierkohle zu und filtrierte heiß ab. Beim Ansäuern des Filtrats mit verdünnter Salzsäure wurde die β-Säure in Gestalt feiner gelber Nadeln ausgeschieden. Diese Operation wurde nochmals wiederholt und schließlich mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Die nadelförmigen Kristalle der β-Säure enthielten 1 Mol. Kristallwasser, das bei 100° nicht völlig entfernt werden konnte. Ein kleiner Teil des Wassers war so fest gebunden, daß es erst bei 130 bis 150° ausgetrieben wurde.

1. 0,2023 g Substanz, die zuvor im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure 10 Tage getrocknet wurden, verloren bei 150° 0,0176 g Wasser = 8,70 Proz. H_2O.

2. 0,2003 g Substanz, die zuvor im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure 10 Tage getrocknet wurden, verloren bei 150° 0,0173 g Wasser = 8,69 Proz. H_2O.

3. 0,1430 g Substanz (bei 150° getrocknet) gaben 0,3056 g CO_2, 0,0459 g H_2O, C = 58,28 Proz., H = 3,56 Proz.

4. 0,1709 g Substanz (bei 150° getrocknet) gaben 0,01207 g N (nach *Kjeldahl*), N = 7,06 Proz.

Wenn man die nadelförmigen Kristalle aus heißem, absolutem Alkohol umkristallisiert, so erhält man rhombische Prismen, die kein Kristallwasser enthalten und deshalb beim Trocknen auf 100° leicht zur Gewichtskonstanz gebracht werden. Die Analyse der so erhaltenen Kristalle ergab folgendes Resultat:

5. 0,1089 g Substanz gaben 0,2327 g CO_2, 0,0355 g H_2O, C = 58,28 Proz., H = 3,62 Proz.

6. 0,1220 g Substanz gaben 0,00872 g N (nach *Kjeldahl*), N = 7,15 Proz.

7. 0,1032 g Substanz gaben 0,2196 g CO_2, 0,0313 g H_2O, C = 58,03 Proz., H = 3,37 Proz.

8. 0,0970 g Substanz gaben 0,2066 g CO_2, 0,0298 g H_2O, C = 58,12 Proz., H = 3,41 Proz.

	Kristallwasser
Gefunden 1.	8,70
„ 2.	8,69
Berechnet für $C_{10}H_7NO_4 + H_2O$	8,07

	C	H	N
Gefunden 1.	58,28	3,56	7,06
„ 2.	58,28	3,62	7,15
„ 3.	58,03	3,37	—
„ 4.	58,12	3,41	—
Berechnet für $C_{10}H_7NO_4$ . .	58,54	3,41	6,83

Die von *Suzuki* aus seinem Rohoryzanin erhaltene α- und β-Säure hatte nach seiner Analyse folgende Zusammensetzung:

	C	H	N		C	H	N
α-Säure. . .	53,29	4,19	7,19	β-Säure .	57,60	3,68	6,82
	53,26	4,43	—		57,88	3,85	—
	53,32	4,39	6,91		57,71	3,91	—

Wie man sieht, ist der C-Gehalt der β-Säure etwas niedriger und der H-Gehalt etwas höher als die für die Formel $C_{10}H_7NO_4$ berechneten Zahlen. Diese Abweichung wird dadurch erklärt, daß er seine Präparate bei 100⁰ trocknete, so daß noch ein kleiner Teil des Kristallwassers haften geblieben war. Um diese Annahme zu bestätigen, hat der Verfasser seine nadelförmigen Präparate bei 100⁰ gewichtskonstant getrocknet und analysiert:

Analyse des bei 100⁰ getrockneten Präparats:

1. 0,1962g Substanz gaben 0,4134g CO_2, 0,0716g H_2O, C = 57,46 Proz., H = 4,04 Proz.

2. 0,1937g Substanz gaben 0,4071g CO_2, 0,0699g H_2O, C = 57,23 Proz., H = 4,00 Proz.

3. 0,2019 g Substanz gaben 0,014 084 g N (nach *Kjeldahl*), N = 6,98 Proz.

4. 0,2008g Substanz gaben 0,01334g N, N = 6,65 Proz.

Andere Präparate wurden im Luftbad bei 100⁰ mehrere Stunden getrocknet und analysiert:

5. 0,1987g Substanz gaben 0,4161g CO_2, 0,0616g H_2O, C = 57,11 Proz., H = 3,45 Proz.

6. 0,1760g Substanz gaben 0,3712g CO_2, 0,0562g H_2O, C = 57,52 Proz., H = 3,55 Proz.

7. 0,1034g Substanz gaben 0,007 19g N (nach *Kjeldahl*), N = 6,95 Proz.

Die Analyse stimmte also mit derjenigen *Suzukis* vollkommen überein, und so unterliegt es keinem Zweifel, daß es sich um ein und dieselbe Substanz handelt.

2. Eigenschaften der β-Säure.

1. Löslichkeit. Die β-Säure ist in kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser etwas leichter, in heißem absoluten Alkohol noch leichter löslich. Die wasserhaltige, nadelförmige β-Säure löst sich in heißem Alkohol und scheidet sich wieder in Gestalt wasserfreier, rhombischer Kristalle aus. Sie ist unlöslich in Aceton, Chloroform, Benzin, Terpentinöl; löslich in: Pyridin, Anilin, heißem Eisessig. In konzentrierter Salz- oder Schwefelsäure oder in Alkalien ist sie auch löslich. Die wässerige oder alkoholische Lösung reagiert ziemlich stark sauer. In verdünntem Alkohol löst sich die Säure mit strohgelber Färbung. Durch Einleiten von Kohlensäure in die alkalische Lösung wird sie nicht gefällt; erst durch Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure wird sie wieder ausgeschieden.

2. Schmelzpunkt. Im Kapillarrohr erhitzt, verwandelt sich die Farbe der β-Säure gegen 150^0 in Orangegelb und gegen 300^0 in schmutzig Grüngelb. Sie schmilzt oder zersetzt sich bis 315^0 nicht. Im Platintiegel vorsichtig erhitzt, verbrennt sie unter teilweiser Sublimierung.

3. Reaktionen. Die β-Säure gibt eine tiefblaue Färbung mit Ferriferricyanidreagenz; sie reduziert ammoniakalische Silberlösung, bildet aber dabei keinen metallischen Spiegel; gibt eine rötlichbraune Färbung mit $FeCl_3$, aber keine grüne Färbung; ferner eine schmutzig rote Färbung mit *Millon*schem Reagenz; eine tief indigoblaue Farbe mit *Folin*schem Reagenz; weiter gibt sie starke rotviolette Färbung mit alkalischer Diazobenzolsulfonsäure und tiefblaue Färbung mit Phosphormolybdänsäure und Ammoniak; aber keine rote Färbung (Flavonolreaktion) mit konzentrierter HCl und Mg.

Sie gibt auch die pyrrol- oder indolähnliche Reaktion, d. h. der durch Kochen der β-Säure mit Kalilauge entwickelte Dampf rötet Holzspäne, die zuvor mit konzentrierter HCl befeuchtet waren; fügt man zu einer Lösung von Eisessig und Natriumnitrit eine verdünnte alkalische Lösung von β-Säure zu, so wird die Flüssigkeit schwach rötlichgelb, bildet aber dabei keinen roten Nitrosokörper. Sie gibt gelbe Farbe mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd unter Zusatz von HCl und $NaNO_2$. Setzt man der wässerigen Lösung von β-Säure Nitroprussidnatrium zu, so verschwindet die gelbe Farbe, die durch Zusatz von Alkali wieder zum Vorschein kommt. Beim Kochen fällt ein brauner Niederschlag aus; bei starkem Ansäuern mit Eisessig erfolgt eine dunkelgrüne Fällung.

4. Molekulargewicht. Da keine geeigneten Lösungsmittel für die β-Säure vorhanden waren, war die kryoskopische Methode nicht anwendbar. Aus den Analysen verschiedener Metallsalze oder Ester, die nachstehend beschrieben werden, nimmt der Verfasser an, daß das Molekulargewicht der β-Säure $C_{10}H_7NO_4 = 205$ ist.

3. Salze und Derivate der β-Säure.

1. Kupfersalz. 0,5 g β-Säure wurden in wenig Wasser suspendiert und mit Ammoniak (1 : 3) so lange versetzt, bis ein entstandener Niederschlag wieder klar gelöst wurde, dann gab man 2 g Kupferacetat in verdünnter Essigsäurelösung unter Schütteln zu. Es schieden sich dabei allmählich hellgelblich grüne Kristalle aus, die mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, darauf getrocknet und analysiert wurden.

Bestimmung des Kupfers:

Im Vakuum bei 100° getrocknet: 0,0979 g Substanz gaben 0,0146 g CuO = 11,92 Proz. Cu.

Im Luftbad bei 120 bis 150° getrocknet: 0,1086 g Substanz gaben 0,0171 g CuO = 12,58 Proz. Cu.

Im Luftbad bei 160 bis 170° getrocknet: 0,0912 g Substanz gaben 0,0152 g CuO = 13,32 Proz. Cu.

Ber.: $(C_{10}H_6NO_4)_2Cu \cdot 3\,H_2O$ . . . . = 12,10 Proz. Cu
$(C_{10}H_6NO_4)_2Cu \cdot 2\,H_2O$ . . . . = 12,52 „ Cu
$(C_{10}H_6NO_4)_2Cu$ . . . . = 13,49 „ Cu

Es scheint also, daß das Kristallwasser erst bei höherer Temperatur entfernt wird.

2. Bariumsalz. Die β-Säure wurde in Ammoniak gelöst, mit Bariumchloridlösung versetzt und auf dem Wasserbad eingedampft. Nach dem Erkalten schieden sich glänzende, gelbe, kugelförmige Kristalle aus, die bei 170° zum konstanten Gewicht getrocknet und analysiert wurden:

0,0996 g Substanz gaben 0,0435 g $BaSO_4$ = 25,70 Proz. Ba.
Ber.: $(C_{10}H_6NO_4)_2Ba$. . . . . = 25,02 Proz. Ba.

Das bei 100° zum konstanten Gewicht getrocknete Präparat enthielt noch 5,33 Proz. Wasser, was ungefähr mit der Formel $(C_{10}H_6NO_4)_2Ba \cdot 2\,H_2O$ stimmte.

3. Natriumsalz. Die β-Säure wurde in Natronlauge gelöst und unter Zusatz von wenig Chlorammonium vorsichtig eingedampft, bis die Lösung fast neutral reagierte. Nach dem Erkalten schieden sich hellgrünlichweiße, seidenähnliche Kristalle aus. Die bei 100° zum konstanten Gewicht getrocknete Substanz enthielt noch 1 Mol. Kristallwasser.

1. 0,1397 g bei 100° getrockneter Substanz verloren bei 150° getrocknet noch 0,0089 g = 6,37 Proz. H_2O.
Ber.: $C_{10}H_6NO_4Na + H_2O$ = 7,35 Proz. H_2O.

2. 0,1308 g bei 150° getrockneter Substanz gaben 0,0332 g NaCl = 10,00 Proz. Na.
Ber.: $C_{10}H_6NO_4 \cdot Na$ = 10,13 Proz. Na.

4. Kaliumsalz. Das Kaliumsalz wurde genau in derselben Weise wie das Natriumsalz dargestellt. Es bildete glänzende gelbe Nadeln. Das im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium zum konstanten Gewicht getrocknete Präparat verlor bei 160° nicht mehr an Gewicht.

0,1529 g Substanz (bei 160⁰ getrocknet) gaben 0,0468 g KCl = 16,06 Proz. K.

Ber.: $C_{10}H_6NO_4K$ = 16,05 Proz. K.

5. Die β-Säure bildete ferner basische Salze mit Silber, Natrium, Ammonium, Calcium usw. Das Silbersalz war gelblich gefärbt und sehr empfindlich gegen Licht. Das Ammoniaksalz bildete weiße, seidenähnliche Kristalle und verlor das Ammoniak vollständig beim Trocknen. Nach der Natur der oben erwähnten Salze scheint die β-Säure eine zweibasische Säure zu sein, was dem Vorhandensein von phenolischen OH-Gruppen zuzuschreiben ist. Das Calciumsalz bildete gelbe, schiffsförmige Kristalle und enthielt kein Kristallwasser.

Analyse des Calciumsalzes:

1. 0,1122 g Substanz gaben 0,0642 g $CaSO_4$ = 16,83 Proz. Ca.
2. 0,0722 g „ „ 0,0413 g $CaSO_4$ = 16,82 „ Ca.
3. 0,1103 g „ „ 0,006 18 g N, 5,60 Proz. N (nach *Günning*).

	Ca	N
Gefunden 1.	16,83	—
„ 2.	16,82	5,60
Berechnet für $C_{10}H_5NO_4Ca$	16,50	5,76

6. Äthylester. Die β-Säure wurde in absolutem Alkohol suspendiert und trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Sie löste sich dabei unter Wärmeentwicklung. Man dampfte nun im Vakuum ein, löste den Rückstand in kaltem absoluten Alkohol, filtrierte von der eventuell noch unveränderten freien β-Säure ab und dampfte wieder ein. Es schied sich dabei der Äthylester der β-Säure in Form gelber, seidenartiger Kristalle aus, die in absolutem Alkohol leicht, in Wasser aber nicht löslich waren. Das im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur zum konstanten Gewicht getrocknete Präparat verlor bei 100⁰ nicht mehr an Gewicht.

Analyse des Äthylesters:

0,0983 g Substanz gaben 0,2205 g CO_2, 0,0431 g H_2O.
0,0936 g „ „ 0,2123 g CO_2, 0,0403 g H_2O.
0,1078 g „ „ 0,006 28 g N, 5,83 Proz. N (nach *Günning*).

	C	H	N
Gefunden 1.	61,18	4,87	5,83
„ 2.	61,85	4,78	—
Berechnet für $C_{10}H_6NO_4 . C_2H_5$	61,80	4,72	6,01

7. Methylester. Die β-Säure wurde in absolutem Methylalkohol suspendiert und genau so behandelt wie beim Äthylester. Man erhielt den Methylester als kurze gelbe Tafeln. Das im Vakuumexsikkator bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Präparat verlor bei 100⁰ nicht mehr an Gewicht.

Analyse des Methylesters.

0,1067 g Substanz gaben 0,2342 g CO_2, 0,0418 g H_2O.
0,0799 g „ „ 0,1754 g CO_2, 0,0309 g H_2O.
0,1197 g „ „ 0,00735 g N, 6,14 Proz. N (nach *Günning*).
0,1004 g „ „ 0,00614 g N, 6,11 Proz. N („ „).

	C	H	N
Gefunden 1.	59,86	4,35	6,14
„ 2.	59,87	4,30	6,11
Berechnet für $C_{10}H_6NO_4CH_3$	60,27	4,11	6,35

Auf Grund oben erwähnter Beobachtung unterliegt es keinem Zweifel, daß die β-Säure eine Monocarbonsäure ist.

8. Acetylderivat. 2 g β-Säure (bei 100° getrocknet) wurden mit 15 g Essigsäureanhydrid unter Zusatz von 1 g wasserfreiem Natriumacetat so lange erhitzt, bis man keine Ferriferricyanidreaktion mehr wahrnehmen konnte. Man goß nun das Reaktionsgemisch in kaltes Wasser und filtrierte vom unlöslichen Rückstand ab. Wenn das klare Filtrat mit starker Säure angesäuert wurde, so erhielt man hellgelbe, fadenartige Kristalle, die nochmals in Essigsäureanhydrid gelöst wurden. Die Lösung wurde darauf in kaltes Wasser gegossen und genau so behandelt wie oben. Zur Analyse wurden die Kristalle im Vakuum über Chlorcalcium und Ätzkali zum konstanten Gewicht getrocknet.

Analyse des Acetylderivats:

0,1144 g Substanz gaben 4,8 ccm N (17°, 760 mm) = 4,85 Proz. N.
0,1920 g „ „ 8,5 „ N (16°, 755,5 mm) = 5,10 Proz. N.
0,5945 g „ „ durch Verseifung 0,23932 g CH_3COOH = 28,85 Proz. ($-CO.CH_3$).
0,7025 g Substanz gaben durch Verseifung 0,27568 g CH_3COOH = 28,12 Proz. ($-CO.CH_3$).

	N	$-CO.CH_3$
Gefunden 1.	4,85	28,85
„ 2.	5,10	28,12
Berechnet $C_{10}H_5NO_4(COCH_3)_2$	4,84	29,76

Die Substanz stimmt also mit dem Diacetylderivat der β-Säure überein. Somit ist nachgewiesen, daß zwei OH-Gruppen in einem Molekül vorhanden sind.

9. Benzoylderivat. Die β-Säure wurde in Pyridin (*Kahlbaum*) gelöst, mit Chloroform verdünnt und unter Eiskühlung mit Benzoylchlorid in Chloroformlösung tropfenweise versetzt, bis sich keine Reaktionswärme mehr entwickelte. Nach 24 Stunden setzte man dem Reaktionsgemisch so viel Benzol zu, bis es vollständig gelöst wurde. Die Flüssigkeit wurde nun mit Alkalien, Säuren und Wasser sukzessiv

geschüttelt und gewaschen. Nach dem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat wurde unter vermindertem Druck eingedampft, um Chloroform und Benzol zu vertreiben. Der zurückgebliebene Benzoylkörper wurde dann im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium und Ätzkali 10 Tage getrocknet und analysiert.

Analyse des Benzoylderivats:

	Substanz g	CO_2	H_2O	C Proz.	H Proz.
1. . . .	0,1176	0,3060	0,0440	71,01	4,16
2. . . .	0,1014	0,2642	0,0386	71,06	4,23
3. . . .	0,1052	2,75 N (26° 759 mm) = 2,83 Proz. N			—

	C	H	N
Gefunden 1.	71,01	4,16	—
„ 2.	71,06	4,23	2,83
Berechnet für $C_{10}H_4NO_4(CO.C_6H_5)_3$ . .	71,95	3,68	2,71

Verseifung des Benzoylkörpers.

Der Benzoylkörper wurde mit einer bestimmten Menge n/2 alkoholischem Kali in gewöhnlicher Weise verseift und mit n/10 H_2SO_4 zurücktitriert. Die Aciditätszunahme, d. h. die Menge des verbrauchten Kalis, ausgedrückt in der Anzahl Kubikzentimeter n/10 H_2SO_4, sowie in Prozenten des H-ions war wie folgt:

	Substanz	0,104 n H_2SO_4 ccm	Acidität (H) Proz.
1.	0,2872	20,5	0,74
2.	0,3019	20,75	0,71
Berechnet für $C_{10}H_4NO_4(CO.C_6H_5)_3$	—	—	0,77

Die Analyse stimmt diesmal mit dem Tribenzoylderivat der β-Säure wahrscheinlich von der Formel

$$C_9H_4N\begin{cases}O.OC.C_6H_5\\O.OC.C_6H_5\\CO.O.OCC_6H_5\end{cases}$$

überein.

10. Einwirkung von Brom auf die β-Säure. 2 g β-Säure und 2 g Cadmiumoxyd (*Kahlbaum*) wurden in Wasser suspendiert und unter Schütteln 30 g Brom tropfenweise zugesetzt. Das Cadmiumoxyd löste sich dadurch vollständig auf, und der größte Teil der β-Säure verwandelte sich in eine harzartige Substanz, die in absolutem Alkohol leicht, in Wasser aber nicht löslich war. Aus wässeriger alkoholischer Lösung schied sich eine zitronengelbe amorphe Substanz aus. Es wurden zwei verschiedene Präparate in dieser Weise dargestellt, bei 100° getrocknet und analysiert:

	Substanz	CO_2	H_2O	C Proz.	H Proz.
Präparat A. 1.	0,1014	0,1208	0,0258	32,49	2,83
Präparat A. 2.	0,1154	0,1360	0,0277	32,14	2,67
Präparat B. 1.	0,1048	0,1169	0,0190	30,85	2,20
Präparat B. 2.	0,0944	0,1065	0,0250	30,77	2,95

	Substanz	N ccm	N Proz.
Präparat A. 1.	0,1240	4,1 (28°, 757,25 mm)	3,6
Präparat A. 2.	0,1030	3,35 (28°, 757,5 „)	3,54

	Substanz	AgBr	Br Proz.
Präparat A. 1.	0,0835	0,0980	49,95
Präparat A. 2.	0,0825	0,0950	49,01

Da die Analyse des Präparats A und B nicht stimmte, kann es kein einheitliches Produkt sein. Vielleicht handelt es sich um ein Zwischenprodukt.

Das Filtrat der harzartigen Substanz lieferte aber nach dem Verdampfen zitronengelbe, durchsichtige kurze Prismen, die mit wenig Wasser gewaschen, auf eine Tonplatte gestrichen und im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium getrocknet wurden. Sie verloren dabei das Kristallwasser und verwandelten sich zu einem hellgelben, amorphen Pulver. In dieser Weise wurden drei verschiedene Präparate dargestellt und bei 100° zum konstanten Gewicht getrocknet und analysiert:

	Substanz	CO_2	H_2O	C Proz.	H Proz.
Präparat I	0,1197	0,0948	0,0143	21,59	1,33
„ II	0,1188	0,0932	0,0122	21,40	1,14
„ III	0,1190	0,0939	0,0141	21,52	1,32

	Substanz	N ccm	N Proz.
Präparat II	0,1188	3,15 (27°, 754 mm)	2,89
„ III	0,1120	3,0 (26°, 753 „)	2,93

	Substanz	AgBr	Br Proz.
Präparat I	0,0836	0,1176	59,86
„ II	0,0926	0,1314	60,39
„ III	0,1303	0,1814	59,24

	C	H	N	Br
Präparat I	21,59	1,33	—	59,86
„ II	21,40	1,14	2,89	60,39
„ III	21,52	1,32	2,93	59,24
Berechnet für $(C_{13}H_5NO_2Br_2HBr)_2CdBr_2$	21,94	1,10	2,56	58,24

Nach der Analyse scheint dieser Körper ein Doppelsalz von $CdBr_2$ mit der bromsubstituierten β-Säure zu sein. Vielleicht wurden zwei OH-Gruppen in der β-Säure durch Brom substituiert.

11. Einwirkung von Salpetersäure auf β-Säure. Die β-Säure wurde in 30 ccm Salpetersäure (1,4) gelöst und vorsichtig auf dem Wasserbad eingedampft. Nach dem Erkalten schieden sich feine weiße, baumwollähnliche Kristalle (A) nebst kurzen farblosen Prismen (B) aus. Dieses Kristallgemisch wurde aus starker Salpetersäure umkristallisiert, auf eine Tonplatte gestrichen und im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium und Ätzkali getrocknet. Die Kristalle (A) verwandelten sich dabei in eine weiße, amorphe Substanz, die sich leicht von (B) mechanisch trennen ließ. Die Kristalle (A) wurden aus ablosutem Äther umkristallisiert. Sie bildeten kurze Prismen und zersetzten sich bei 240 bis 241°. Die Analyse zeigte, daß sie mit Juglonsäure (Dinitro-3-oxybenzol-1, 2-dicarbonsäure) große Ähnlichkeit hatten.

Die Kristalle (B) wurden als Oxalsäure identifiziert, sie schmolzen bei 184° (unkorrigiert) und zeigten alle charakteristischen Reaktionen der Oxalsäure.

Die Kristalle (A) wurden im Luftbad bei 100° getrocknet und analysiert:

	Substanz	CO_2	H_2O	C Proz.	H Proz.
1.	0,0918	0,1165	0,0146	34,61	1,77
2.	0,0933	0,1192	0,0144	34,84	1,72
3.	0,1185	0,1557	0,0187	35,83	1,75
4.	0,1104	0,1457	0,0174	35,99	1,75
Berechnet f. $C_8H_4N_2O_9$ (Juglonsäure)	—	—	—	35,29	1,47

	Substanz	N g	N Proz.
1.	0,1730	0,01731	10,00 (nach *Günning*)
2.	0,1081	0,01099	10,17 („ „)
3.	0,1006	9,1 ccm (13°, 764,2 mm)	10,70 („ *Dumas*)
Berechnet für $C_8H_4N_2O_9$	—	—	10,29

Das bei Zimmertemperatur zum konstanten Gewicht getrocknete Präparat enthielt noch 2 Mol. Kristallwasser. Die Analyse ergab folgendes Resultat:

0,1327 g Substanz verloren bei 100° 0,0142 g H_2O = 10,70 Proz.
0,1208 g „ „ „ 100° 0,0127 g H_2O = 10,51 „
0,1340 g „ „ „ 100° 0,0142 g H_2O = 10,69 „
Ber.: $C_8H_4N_2O_9 . 2 H_2O$ = 11,69 Proz.

Substanz	CO_2	H_2O	C Proz.	H Proz.
0,1028	0,1175	0,0234	31,17	2,53
Berechnet für $C_8H_4N_2O_9 . 2H_2O$			31,17	2,27

Die Molekulargewichtsbestimmung der wässerigen Lösung nach der kryoskopischen Methode gab kein befriedigendes Resultat, weil die Lösung stark sauer reagierte, so daß ein Teil derselben dissoziiert sein mußte.

Zur Bestimmung der Acidität wurde die Substanz in Wasser gelöst und mit n/10 KOH titriert (Kongorot als Indikator). Die Acidität als Prozente des H-Ions war 1,08 Proz.

Ferner wurden das Barium- und Silbersalz dargestellt. Der Verfasser nimmt deshalb an, daß diese Substanz eine tribasische Säure ist. Wahrscheinlich handelt es sich um Juglonsäure oder ein Isomeres derselben.

Von der Tatsache ausgehend, daß Chinolin aus der β-Säure durch Zinkstaubdestillation gebildet wird, kann man die Bildung des Benzolderivats durch Oxydation des Chinolinkerns leicht verstehen. Die Oxalsäure ist vielleicht aus α- und β-Kohlenstoff des Pyridinringes gebildet worden. Ferner ist es sehr wahrscheinlich, daß die COOH-Gruppe in der β-Säure im Benzolring vorhanden ist.

12. Kalischmelzen. Kalischmelzen der β-Säure führten zu keinem endgültigen Resultat; 5 g β-Säure wurden mit 50 g kaustischem Kali (*Merck*) und 10 ccm Wasser in einen Bronzetiegel gebracht, mit dem Kork verstopft und 3 bis 4 Stunden bei 280° erhitzt. Die dabei abdestillierte Flüssigkeit reagierte stark alkalisch und gab die Ferriferricyanid- sowie die Nitroprussidreaktion. Sie gab ein körniges Platindoppelsalz, das bei über 300° schmolz. Wegen Mangel an Material wurde es nicht weiter untersucht.

Die im Tiegel zurückgebliebene Schmelze wurde in wenig Wasser gelöst, mit Schwefelsäure (1 : 1) angesäuert, dann wurde sie mit Natriumchlorid gesättigt und ausgeäthert. Die ätherische Lösung gab eine rote Färbung mit Salz- oder Schwefelsäure, reduzierte ammoniakalisches Silbernitrat und bildete dabei einen Metallspiegel.

Das Cuprisalz wurde auch zu Cuprosalz reduziert. Ferner gab sie die Ferriferricyanidreaktion. Wird die ätherische Lösung mit Alkali versetzt und erwärmt, so entwickelt sich ein Dampf, der mit Salzsäure

befeuchtete Holzspäne rötet. Aus dieser Reaktion ersieht man, daß es sich um ein Pyrrol- oder Indolderivat handelt.

Wenn man zu der ätherischen Lösung eine ätherische Lösung von freiem Phenylhydrazin hinzufügte, so erhielt man ein in Wasser und Äther schwer lösliches Phenylhydrazon, das sich bei etwa 170 bis 180° zersetzte.

Die Analyse des bei 100° getrockneten Hydrazons ergab folgendes Resultat:

	Substanz	CO	HO	C Proz.	H Proz.
Präparat A. 1.	0,0661	0,1260	0,0432	51,99	7,24
Präparat A. 2.	0,0590	0,1127	0,0368	52,10	6,93
Präparat B.	0,0706	0,1379	0,0425	53,27	6,69

	Substanz	N ccm	N Proz.
Präparat A. 1.	0,0446	7,7 (27°, 760 mm)	18,87
Präparat A. 2.	0,0416	7,2 (28°, 757 „)	18,82
Präparat B.	0,0824	13,8 (26°, 759 „)	18,45

	C	H	N
Gefunden 1.	51,99	7,24	18,87
„ 2.	52,10	6,93	18,82
„ 3.	53,27	6,69	18,45
Berechnet für $C_{10}H_{17}N_3O_3$, oder $C_{10}H_{11}N_3 + 3H_2O$	52,86	7,49	18,50

13. Zinkstaubdestillation. 5 g β-Säure wurden in einem harten Glasrohr, welches an einem Ende zugeschmolzen war, mit 25 g Zinkstaub gemischt und im Elektroofen allmählich erhitzt. Bei 450 bis 550° beobachtete man, daß ein gelbes Öl im oberen Teile des Rohres kondensierte. Dieses Öl wurde in Äther gelöst und mit wässeriger Pikrinsäure versetzt. Es bildete sich ein kristallinisches Pikrat des Chinolins, das mit Wasser und Äther gewaschen und aus Benzol umkristallisiert wurde. Es schmolz bei 200 bis 201° (unkorrigiert) und war mit reinem Chinolinpikrat, welches aus Chinolin (*Kahlbaum*) dargestellt wurde, vollkommen identisch. Bei der Mischprobe änderte sich der Schmelzpunkt nicht.

Analyse des Chinolinpikrats:

0,0284 g Substanz gaben 4,1 ccm N (26,5°, 754,5 mm), N = 15,78 Proz.

0,0440 g Substanz gaben 0,0807 g CO_2, 0,0190 g H_2O, C = 50,03 Proz., H = 4,80 Proz.

0,0506 g Substanz gaben 0,0929 g CO_2, 0,0248 g H_2O, C = 50,07 Proz., H = 5,44 Proz.

0,1213 g Substanz gaben 0,1779 g Nitronpikrat = 0,075303 g Pikrinsäure = 62,08 Proz. Pikrinsäure.

	C	H	N	Pikrinsäure
Gefunden 1.	50,03	(4,80)	15,78	62,08
„ 2.	50,08	(5,44)	—	—
Berechnet für $C_9H_7N \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$	50,28	2,79	15,64	63,96

Zusammenfassung.

1. Die von *U. Suzuki* aus seinem Rohoryzanin (antineuritische Substanz) durch Säurespaltung erhaltene β-Säure ($C_{10}H_7NO_4$) wurde vom Verfasser in größeren Mengen dargestellt, um die chemische Natur derselben weiter zu studieren.

2. Der Verfasser hat verschiedene Salze, Ester, Acetyl- und Benzoylderivate, Nitroverbindung, sowie Bromderivate der β-Säure dargestellt und bestätigt, daß zwei OH- und eine COOH-Gruppe darin vorhanden sind. Ferner erhielt er Chinolin durch Zinkstaubdestillation. Der Verfasser nimmt deshalb an, daß die β-Säure eine Dihydroxychinolincarbonsäure ist, und zwar wahrscheinlich von einer der folgenden Strukturformeln:

COOH (HO, OH, N) oder COOH (HO, OH, N) $= C_{10}H_7NO_4$.

Die relative Stelle der COOH- und OH-Gruppe ist freilich nicht sicher.

Herrn Prof. *U. Suzuki* spreche ich meinen aufrichtigen Dank für seine freundlichen Ratschläge aus. Auch ist es mir eine angenehme Pflicht, der Firma Sankyo & Co. für die freundliche Lieferung des Ausgangsmaterials und Herrn *R. Yamamoto* für die sorgfältigen Gärversuche zu danken.

Über die Wirkung von Thyreoidin, Cerebrin und Cordin auf die anaerobe Atmung der Hefe.

Von

L. P. Rosenow.

[Aus dem physiologischen Institut der Staatsuniversität Minsk (Weißrußland)].

(Eingegangen am 20. März 1925.)

Zur Lösung verschiedener Probleme der Biochemie stellen die Pflanzenzellen ein bequemes Objekt dar, das meiner Meinung nach auch zur näheren Erforschung der physiologischen Wirkung der tierischen Hormone angewandt werden könnte.

Den Arbeiten (1) von *C. Neuberg* mit *M. Ehrlich*, *E. Reinfurth* und *M. Sandberg* verdankt man die Feststellung, daß eine große Reihe chemisch definierter Substanzen die alkoholische Zuckerspaltung verstärkt. Zu diesen Verbindungen gehört nach *M. Tomita* (2) auch das Thyroxin; der letztgenannte Autor arbeitete nicht mit Hefezellen, sondern mit gärwirksamem Hefesaft.

Nach dieser Richtung habe ich weiter einige orientierende Versuche unternommen.

Wir beschlossen vor allem, die Wirkung des Thyreoidins, als des am meisten erforschten Stoffes, zu ermitteln. Auf meinen Vorschlag übernahm Herr stud. *Feschtschenko* diese Versuche in unserem Laboratorium. Als analytisches Verfahren zur Bestimmung der alkoholischen Gärung diente die Volumenmessung des sich bildenden Gases. In die Probiergläser, die für diese Versuche benutzt wurden, wurde eine Lösung (5 Proz.) von Rübenzucker unter Zusatz von Hefe und Thyreoidin eingefüllt (Thyreoidin „Poehl" als Pulver). Zu jeder Versuchsreihe wurden verschiedene Dosen von Thyreoidin genommen (0,5, 0,2 und 0,05 g), die Kontrollgläser enthielten kein Thyreoidin. Die Probiergläser wurden in ein Glas gestülpt, auf dessen Boden sich eine geringe Menge derselben Mischung befand; die Gase sammelten sich an dem geschlossenen Ende, wo ihr Volumen sodann zu verschiedenen Zeiten gemessen wurde. Dieses Verfahren ist eine etwas abgeänderte Art der gebräuchlichen Methode mit Gärungsbüretten, eines Verfahrens, das kurzdauernde Ablesungen vorzunehmen ermöglicht, was äußerst bequem für die Beurteilung der Kinetik der Gärung ist [*Kostytscheff* (3)].

Eine Reihe von Untersuchungen, die von *Feschtschenko* unternommen wurden, haben erwiesen, daß das Thyreoidin eine bestimmte

und ziemlich regelmäßige Wirkung hervorruft, nämlich: bei der angewandten Menge von 0,2 g auf 50,0 ccm Zuckerlösung verdoppelt es die Bildung von CO_2. Eine Nachprüfung meinerseits bei etwas veränderten Bedingungen ergab dasselbe Resultat.

Die gleiche Menge (25,0 bis 30,0 g) käuflicher, abgepreßter Hefe wurde abgewogen und mit einem Messer fein zerteilt, wobei das Thyreoidin während der Zerkleinerung in einer Menge von 0,2 g beigemischt wurde. Dann wurde die Hefe (rein bzw. mit Thyreoidin) in einen 250-ccm-Kolben zusammen mit 6 Proz. Zuckerlösung gebracht. Die Kolben waren verschlossen durch Stopfen, durch welche Glasröhrchen hindurchgeführt waren, (Länge bis 30 cm, Durchmesser bis 4 mm), welche die Gase in die umgestülpten Kolben (250 ccm) hinüberleiteten. In diesen sammelte sich die gesamte sich bildende Kohlensäure an. Das Aufstellen dieser Gasauffänger wurde sehr schnell durch das Herablassen einer Metallklammer bewerkstelligt, die ein Lineal festhielt, an das genau senkrecht die Gasauffänger angehängt waren.

Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 16° R vorgenommen, einige Experimente bei 33° C.

Eines der Protokolle lautet:

Experiment am 11. Februar 1925.

Probierglas 1 Zucker + Hefe + 0,2 g Thyreoidin auf 50,0 ccm
,, 2 ,, + ,, + 0,5 g ,, ,, 50,0 ,,
,, 3 ,, + ,, + 0,05 g ,, ,, 50,0 ,,
,, 4 ,, + ,,
,, 5 ,, + ,,
,, 6 ,, + ,, + 1 Tropfen tinct. jodi auf 50,0 ccm

Die Probiergläser wurden bei 33° C um 12 Uhr 35 Minuten aufgestellt. Um 1 Uhr 50 Minuten machte sich der Anfang der Gasbildung bemerkbar, und zwar in der Reihenfolge 2, 6, 1, 3, 5, 4.

Das Messen der entwickelten CO_2 geschah in folgenden Zeiträumen und ergab:

Nr. der Probiergläser	2h 50′	3h 20′	4h 20′	4h 35′	5h	6h	8h
	Höhe der Gassäule in mm						
1	5	6	10	12	15	25	45
2	5	6	11	14	19	34	60
3	2	2,2	6	7	7	12	28
4	2	2,2	8	9	12	22	45
5	2	2,2	7	8	10	20	53
6	2	3,0	8	9	12	23	43

Es hat sich also erwiesen, daß in den ersten Stunden die Bildung der CO_2 bedeutend intensiver in den Probiergläsern mit Thyreoidin vor sich ging, später aber sich der Unterschied immer mehr ausglich. Eine kleine Dose (0,05 g) Thyreoidin wirkt nicht.

Gleichzeitig mit dem Thyreoidin erprobte ich in dieser Versuchsgruppe die Wirkung noch zweier organisch-therapeutischer Präparate (*Poehl*), das Cordin und das Cerebrin, in Ampullen für subkutane Injektion. Von diesen Extrakten wurden 1,0 ccm Cordin bzw. Cerebrin auf 50,0 ccm genommen. Die Probiergläser wurden zu den vorhergehenden gestellt, und es erwies sich, daß diese Präparate in ihrer Wirkung auf die Energie der Zuckerzerlegung durch die Hefe das Thyreoidin bedeutend übertreffen.

Das ersieht man aus folgenden Zahlen:

Nr. der Probiergläser	2h 50′	3h 20′	4h 20′	4h 35′	5h	6h	8h
	Höhe in mm						
1 (Cordin)	11	13	25	28	34	50	75
2 (Cerebrin)	8	9	18	20	26	45	70
3 0,5 g (Thyreoidin) .	5	6	11	14	19	34	60

Von quantitativer Bedeutung ist hier eigentlich nur die Beobachtung in den ersten Stunden, da mit dem zunehmenden Unterschiede zwischen den Flüssigkeitssäulen ungleiche Größebedingungen für die kohlensäureerzeugende Flüssigkeitssäule entstehen. Freilich kann man diesen Unterschied nicht proportional der Höhe der Flüssigkeitssäule annehmen, da sich die Hefe infolge ihres relativen Gewichts auf dem Boden absetzt. [Das relative Gewicht des Protoplasmas = 1,069 (4); das unmittelbar aräometrisch festgestellte relative Gewicht unserer Lösung aber betrug durchschnittlich 1,011.]

Besonders energisch als Verstärker der Zuckerspaltung wirkt also das Cordin, das die Wirkung des Thyreoidins um mehr als das Doppelte übertrifft. Dann folgt das Cerebrin. Beide enthalten kein Eiweiß. Trotzdem kann nicht als erwiesen gelten, ob hier das Hormon oder stickstoffhaltige Stoffe, welche die Hefemasse vergrößern, einwirken, da in dieser Richtung keine Forschungen unternommen wurden.

Es bleibt nur die Tatsache bestehen, daß eine Beimischung von Eiweiß und anderen stickstoffhaltigen Stoffen, wie z. B. des Serums von Pferdeblut, die Bildung der CO_2 noch erhöhte, wie aus folgendem Protokoll ersichtlich ist:

Experiment am 8. Februar 1925.

Nr. der Probiergläser		4h mm	5h mm
1	Zucker 5 Proz. + Hefe + 2,0 Serum	25	35
2	„ 5 „ + „ + 1,0 „	35	50
3	„ 5 „ + „ + 1,2 Cerebrin	11	25
4	„ 5 „ + „ + 1,2 Cordin	20	30
5	„ 5 „ + „ + 0,2 Thyreoidin	9	15
6	„ 5 „ + „	5	7

Was den quantitativen Wert der Zahlen anbetrifft, so bleibt oben Erwähntes bestehen.

Am meisten zutreffend sind die Zahlen der ersten senkrechten Reihe, dann der zweiten usw.

Die Schwankungen der Zuckerkonzentration in bedeutendem Umfang haben auf die Geschwindigkeit der CO_2-Bildung keinen Einfluß, was folgendes Protokoll zeigt:

Experiment am 18. Februar 1925.

Nr. der Probiergläser		3h 45′	4h 45′	5h 45′	6h 45′	8h 15′
		Höhe der Säule der CO_2 in mm				
1	50,0 proz. Zuckerlösung 5 Proz. + 1,0 Hefe	0	0	0	0	0
2	50,0—10 proz. Zuckerlösung + 1,0 „	0	0	0	0	0
3	50,0— 5 „ „ + 2,0 „	0	0	Anfang	Anfang	9
4	50,0—10 „ „ + 2,0 „	0	0	„	„	9
5	50,0— 5 „ „ + 4,0 „	0	Anfang	9	35	84
6	50,0—10 „ „ + 4,0 „	0	„	6	27	84

Die Quantität der Hefe hat jedoch einen größeren Einfluß, als man bei Annahme eines einfachen Zahlenverhältnisses erwarten könnte. Diese Nichtübereinstimmung einer einfachen Zahlenbeziehung tritt auch in folgendem Versuch scharf hervor:

Experiment am 20. Februar 1925.

Nr. der Probiergläser		30h	35h	38h	Die Probiergläser wurden wieder mit derselben Lösung gefüllt	10h	14h	19h
1	50,0 Proz. Zuckerlösg. + 2,0 Hefe	0	0	0		0	0	0
2	50,0 „ „ + 4,0 „	0	0	0		Anfang	Anfang	Anfang
3	50,0 „ „ + 8,0 „	15	25	30		13	17	25
4	50,0 „ „ +16,0 „	70	85	90		28	38	54

Auch tritt hier nicht die Gesetzmäßigkeit in Erscheinung, der die Fermente sonst bei ihrer Konzentrationserhöhung folgen (Regel von *Schütz-Boryssoff*).

Ich glaube, man kann gegenwärtig aus den oben angeführten Versuchen folgende Schlüsse ziehen:

1. Das Thyreoidin in einer Dosis von 0,2 bis 0,5 g auf 50,0 ccm erhöht die Bildung von CO_2 durch Hefe aus Zucker bei anaerober Atmung.

2. Das Cerebrin in einer Dosis von 1,0 ccm auf 50,0 ccm übertrifft die oben erwähnte Wirkung des Thyreoidins.

3. Das Cordin wirkt noch stärker, es übertrifft bedeutend die Wirkung des Cerebrins.

4. Das Blutserum in entsprechenden Dosen wirkt noch stärker als die erwähnten Präparate.

5. Die Bildung der CO_2 durch Hefe wächst mit dem Vergrößern der Hefemenge nicht nur infolge des einfachen Zahlenverhältnisses, sondern *hauptsächlich aus irgendwelchen anderen Gründen.*

Literatur.

1) *C. Neuberg, M. Ehrlich, E. Reinfurth* u. *M. Sandberg*, diese Zeitschr. 1915–1921. — 2) *M. Tomita*, ebendaselbst **181**, 1922. — 3) *S. Kostytscheff*, Die Physiologie der Pflanzen **1**, 1924. — 4) *J. F. Leontjeff*, Zur Biophysik der niederen Organismen; Die Feststellung des relativen Gewichts von Dunaliella viridis Teod., Russ. Arch. der Protistologie **3**, 1924.

Über die Wirkung der Galle auf die Verdauung des Eiweißes durch den pankreatischen Saft.

Von

L. P. Rosenow (Minsk).

[Aus der physiologischen Abteilung des Instituts für experimentelle Medizin (Leningrad)].

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Auf Veranlassung von Prof. *J. P. Pawlow* beschäftigte ich mich mit der Erforschung der Gallenwirkung auf die Eiweißverdauung durch den Saft der Pankreasdrüse. Schon früher[1]) war im *Pawlow*schen Laboratorium die günstige Wirkung der Galle auf die Eiweißverdauung durch das Trypsin des Pankreassaftes vom Hunde festgestellt worden.

Mir standen eigens zu diesem Zwecke operierte Hunde zur Verfügung, mit einer Fistel der Pankreasdrüse nach *Pawlow*, mit einer *Thiry-Vella*schen Darmfistel und mit einer Fistel der Gallenblase mit Verband des ductus choledochus. Mittels eines metallenen Katheters, eingestellt in den nach außen geführten Kanal der Drüse, wurde ausschließlich zymogener Pankreassaft erhalten.

Die Aktivierung des zymogenen Saftes wurde bewerkstelligt durch Hinzufügen von Darmsaft, der von dem Hunde mit der Fistel gesammelt wurde, entweder während der periodischen Tätigkeit des Saftes oder auf mechanische Weise, indem man in den durchgeschnittenen und nach außen geführten Darm eine Kautschukdrainage einlegte[2]).

---

[1]) *B. G. Brüno*, Dissertation, St. Petersburg 1898; *Klodnitzky*, Dissertation, St. Petersburg 1902; *I. P. Schegalow*, Dissertation, St. Petersburg 1900; *I. I. Lintwaroff*, Dissertation, St. Petersburg 1901.

[2]) Zur Aktivierung wurde zu 2,0 ccm Pankreassaft 0,1 ccm Darmsaft hinzugefügt.

Bei letzterem Verfahren nahmen wir gewöhnlich nur die ersten Portionen des Darmsaftes, da in diesen bekanntlich die Konzentration der Kinase größer ist. Die Kraft der Verdauung wurde nach *Mett* bestimmt.

Vor allem hatten wir festgestellt, daß die Zugabe von Galle in die Mischung des Pankreas- und Darmsaftes die Verdauung der Eiweißstoffe erhöht.

Wir führen hier ein entsprechendes Protokoll an:

7. August 1922.

Pankreassaft ccm	Darmsaft	Galle, roh	Galle, gekocht	Verdauung in mm nach *Mett*.		
				nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 18 Std.
2,0	0,1	0,3	—	0	Spuren	7,0
2,0	0,1	0,5	—	0	Spuren	7,0
2,0	0,1	—	—	0	1,0	3,5
2,0	0,1	—	0,5	0	Spuren	5,0

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Verdauung zuerst im Probierglas ohne Galle anfing, d. h. die Galle hemmt die Aktivierung des Pankreassaftes durch den Darmsaft.

Auf Grund früherer Untersuchungen [*E. A. Hanicke*[1])] wurde bewiesen, daß, wenngleich der Darmsaft auch ein reichlicheres und schnelleres Anwachsen des Trypsins in dem Zymogensaft bewirkt, darauf aber auch desto eher seine Zerstörung beginnt, die sehr schnell vor sich geht, so daß man schon nach 6 Stunden in dem aktivierten Safte eine deutliche Verminderung des Trypsins beobachten kann. Infolgedessen nahmen wir an, daß die Endverstärkung der verdauenden Tätigkeit durch den Umstand bedingt wird, daß die Galle, indem sie die Aktivierung hemmt, dadurch das Trypsin vor der Selbstverdauung bewahrt. Um diese aktivierungshemmende Wirkung auf die Erhaltung des Trypsins auszuschließen, fingen wir an, Probiergläser zum Zwecke der Voraktivierung in einen Thermostaten auf 2, sogar 3 Stunden zu stellen, den Pankreassaft mit dem Darmsaft vermischend.

Auf solche Weise hatten wir es mit einem vollständig aktivierten Safte zu tun. Und hätte die Galle nur durch die Bewahrung des Trypsins vor der Selbstverdauung die Eiweißverdauung gefördert, indem sie die Aktivierung des Trypsinogens hemmte, so wäre auch bei diesem Versuchsverfahren keine Verstärkung durch die Galle erfolgt.

Wie das Protokoll zeigt, war die durch die Galle bewirkte Verstärkung erhalten geblieben.

---

[1]) *E. A. Hanicke*, Bottkins Zeitung für Krankenhäuser, Jahrg. 1901, Nr. 20.

1. September 1922.

Pankreassaft	Darmsaft	Galle, roh	Galle, gekocht	$^1/_3$ Proz. Sodalösung	Verdauung in mm nach *Mett*			Bemerkungen
					nach 2 Std.	nach 15 Std.	nach 20 Std	
2,0	0,1	—	—	0,5	0,5	2,6	3,0	Mit vorhergehender Aktivierung im Thermostaten während 2 Std. bei Anwesenheit von Galle.
2,0	0,1	0,5	—	—	1,0	6,0	7,5	
2,0	0,1	—	0,5	—	1,0	7,0	8,0	
2,0	0,1	—	—	0,5	0,35	2,5	2,5	Dasselbe, nur ist die Galle nach vorhergehender Aktivierung hinzugefügt.
2,0	0,1	0,5	—	—	0,9	5,5	6,75	
2,0	0,1	—	0,5	—	0,9	4,75	6,25	
2,0	0,1	—	—	0,5	0,2	3,0	3,5	Ohne vorhergehende Aktivierung.
2,0	0,1	0,5	—	—	0,4	6,0	7,5	
2,0	0,1	—	0,5	—	Spuren	7,0	8,5	

Ein Unterschied in der Verstärkung durch rohe und gekochte Galle wurde nicht festgestellt.

Nachdem wir noch eine Reihe von Versuchen zur Beobachtung des Verlaufs der Eiweißverdauung nach gewissen Stunden unternommen hatten, bemerkten wir, daß die Verdauungskraft in den Probiergläsern ohne Galle bedeutend schneller sinkt als in den Probiergläsern mit Galle, in denen sich die Fermentmenge lange Zeit unverändert hält. Hierauf beziehen sich die folgenden Protokolle:

3. September 1922.

Pankreassaft	Darmsaft	Galle, roh	Galle, gekocht	$^1/_3$ Proz. Sodalösung	Verdauung nach *Mett* nach Verlauf von				
					2 Std.	4 Std.	6 Std.	8 Std.	10 Std.
2,0	0,1	—	—	0,5	0,75	1,5	1,5	2,0	2,5
2,0	0,1	0,5	—	—	0,5	1,25	2,0	3,0	3,4
2,0	0,1	—	0,5	—	0,75	1,75	2,2	2,75	3,7

4. September 1922.

Pankreassaft	Darmsaft	Galle, roh	Physiolog. Lösung	Verdauung nach *Mett* nach Verlauf von					
				16 Std.	18 Std.	20 Std.	22 Std.	24 Std.	26 Std.
2,0	0,1	—	—	4,25	4,5	4,5	4,75	5,0	5,0
2,0	0,1	—	0,5	3,75	4,5	5,0	5,25	5,0	5,0
2,0	0,1	0,5	—	6,25	6,5	7,5	8,0	8,5	8,5
2,0	0,1	0,5	—	6,25	7,0	7,5	8,0	8,5	8,5
2,0	0,1	0,5	—	6,25	7,0	7,5	8,0	8,25	8,7

Wir wenden uns nun zur näheren Betrachtung unserer Versuchsergebnisse. Nehmen wir die Quadrate der Zahlen, die die Menge des verdauten Eiweißes in den Probiergläsern mit und ohne Galle angeben.

und untersuchen wir das Verhältnis der ersten zu den zweiten nach je 2 Stunden, d. h. vergleichen wir die Fermentmenge (Regel *Schütz-Boryssoff*), so sehen wir, daß sich dieses Verhältnis in den ersten 2 Stunden unter 1 hält, nach 4 Stunden gleich 1 ist, nach 6 Stunden fast gleich 2 geworden ist und weiter ständig wächst.

Das	Verhältnis	nach	2	Stunden	0,69
„	„	„	4	„	1,0
„	„	„	6	„	1,9
„	„	„	8	„	2,0
„	„	„	10	„	2,0
„	„	„	16	„	2,3
„	„	„	18	„	2,44
„	„	„	20	„	2,49
„	„	„	22	„	2,56
„	„	„	24	„	2,89

Diese Erscheinung kann verursacht sein entweder durch das Anwachsen der Fermentmenge in den Probiergläsern mit Galle oder durch Verminderung in den Probiergläsern ohne Galle. Wenn wir die Zahlen, welche die Menge des verdauten Eiweißes innerhalb jeder 2 Stunden in den Probiergläsern mit und ohne Galle anzeigen, näher untersuchen, so wird es ersichtlich, daß das relative Anwachsen der Fermentmenge in den Probiergläsern mit Galle durch die Verminderung des Ferments ohne Galle erklärt werden kann.

Menge des verdauten Eiweißes in Millimetern in den Probiergläsern mit und ohne Galle im Verlauf von je 2 Stunden.

	Mit Galle	Ohne Galle		Mit Galle	Ohne Galle
2 Stunden	0,5	0,75	18 Stunden	0,75	0,25
4 „	0,75	0,75	20 „	0,5	0,0
6 „	0,75	0,0	22 „	0,5	0,25
8 „	1,0	0,5	24 „	0,5	0,25
10 „	0,4	0,5			

Wie schon erwähnt wurde, geht die Zerstörung des Trypsins bei starker Konzentration der Kinase sehr schnell vor sich, deshalb war zu erwarten, daß eben in diesen Fällen auch die begünstigende Einwirkung der Galle besonders scharf hervortritt. In der Tat sieht man aus dem unten angeführten Protokoll des Versuches vom 7. September 1922, daß nach Verlauf von 22 Stunden das Verhältnis der Quadratzahlen der Millimeter verdauten Eiweißes in den Probiergläsern mit Galle bis 5 gestiegen war, während es in den zwei ersten Stunden ungefähr gleich 1 war. Folglich zeigte sich hier der Mengenunterschied des Ferments noch schärfer.

7. September 1922.

Pankreassaft	Darmsaft	Galle, roh	Galle, gekocht	1/3 Proz. Sodalösung	Verdauung nach *Mett* nach Verlauf von							
					2 Std.	5 Std.	22 Std.	—	3 Std.	6 Std.	9 Std.	24 Std.
2,0	0,3	—	—	0,5	0,2	1,4	3,5	*)	0,1	0,1	0,2	0,7
2,0	0,3	0,5	—	—	0,2	2,0	7,75	*)	0,5	0,2	1,7	4,75
2,0	0,3	—	0,5	—	0,4	2,0	7,75	*)	0,4	1,0	1,3	4,75

*) In denselben Saft sind neue Stäbchen gelegt.

Wir können also auf Grund unserer Versuche den Schluß ziehen, daß das Vorhandensein der Galle die Eiweißverdauung durch das Trypsin des Pankreassaftes in beträchtlichem Grade begünstigt.

Diese Verstärkung wird dadurch verursacht, daß die Galle auf irgend eine Weise die Selbstverdauung des aktiven Trypsins verhindert.

Zweifellos sichert die Galle diese Verdauung in bedeutendem Maße bei natürlichen Verhältnissen, wo die Verdauung des Eiweißes mehrere Stunden währt.

Schlußfolgerungen.

1. Die Galle sichert in bedeutendem Maße die Eiweißverdauung durch den pankreatischen Saft.

2. Die Galle bewahrt das aktive Trypsin vor der Selbstzerstörung, infolgedessen sich im Verlauf einiger Zeit das Quantum des verdauten Eiweißes proportional der Zeit erhöht.

3. Das Aufkochen der Galle nimmt ihr nicht die Fähigkeit, das Trypsin vor der Selbstzerstörung zu bewahren.

4. Die Galle hält das Aktivieren des zymogenen pankreatischen Saftes durch den Darmsaft auf, deshalb geht in den ersten 2 Stunden die Verdauung in vitro ohne das Voraktivieren manchmal schneller vor sich (besonders bei schwacher Kinase) als bei vorhandener Galle.

5. Nach dem Voraktivieren geht die Verdauung plötzlich schneller vor sich, bei vorhandener Galle.

Über ein vereinfachtes Verfahren[1]) zur Darstellung des neuen Oxalats aus dem menschlichen Harn.

Von

Wm. O. Moor (Leningrad).

(Eingegangen am 1. April 1925.)

Da der Nachweis des Vorkommens von U-Stoff im Harn in erster Reihe durch das neue Oxalat geführt ist, so hielt ich es für vorteilhaft, seine Darstellung auf folgende Weise zu vereinfachen:

100 ccm Urin von saurer Reaktion und guter Gelbfärbung (spezifisches Gewicht 1,020 bis 1,025) werden im Vakuum bei etwa 50° ganz eingedampft und der Rückstand wird mit etwa 100 ccm kalten absoluten Alkohols extrahiert. Die alkoholische Flüssigkeit wird filtriert, der Alkohol im Vakuum bei etwa 40° verjagt und der Rest im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Der trockene Rückstand wird in 50 ccm absoluten Alkohols gelöst und unter Umschwenken des Kolbens mit 150 ccm Äther vermengt. Der klar gewordene Alkohol-Äther wird dekantiert, der Rückstand im Kolben in 25 ccm Alkohol gelöst und mit 3 Volumen Äther vermengt. Nachdem auch dieser Alkohol-Äther dekantiert worden ist, wird der Kolben mit ein wenig Äther trocken gewaschen und der U-Stoff, der am Boden und an den Wänden des Kolbens haftet, in 10 bis 15 ccm Alkohol gelöst[2]). Durch Filtrieren wird der U-Stoff von Beimengungen (Chloriden, Urochrom und anderen) befreit und das Filtrat mit 50 ccm Amylalkohol vermengt, der mit wasserfreier Oxalsäure gesättigt ist. Um nicht zu viel Oxalat zu verlieren, ist es ratsam, den Äthylalkohol bei Zimmertemperatur im Vakuum zu verjagen. Der oxalsaure Niederschlag wird mittels Äthers von Amylalkohol und freier Oxalsäure befreit. Der Unterschied zwischen dem neuen Oxalat und echtem oxalsauren Harnstoff kann in der schon beschriebenen Weise festgestellt werden[3]).

---

[1]) Diese Zeitschr. **149**, 575.

[2]) Der U-Stoff kann mikroskopisch untersucht werden, indem man 2 bis 3 Tropfen dieser Lösung auf einer Glasplatte verdunsten läßt und den Rückstand über H_2SO_4 trocknet.

[3]) Ebendaselbst **149**, 579. Ich gebrauchte ein Mikroskop mit 140- bis 150facher Vergrößerung.

Von welcher Bedeutung das neue Oxalat für den Pathologen ist, ergibt sich aus folgender Betrachtung:

Im Jahre 1904 veröffentlichte ein junger russischer Gelehrter, *N. Werschinin*, gegenwärtig Professor der Pharmakologie an der Universität zu Tomsk, eine eingehende Arbeit über die Ursache der Giftigkeit des normalen Harnes[1]). Auf Grund genauer chemischer Untersuchungen und entsprechender Tierversuche gelangte *Werschinin* zur Schlußfolgerung, daß die wesentlichste Ursache der Giftigkeit des normalen Harnes eine organische, stickstoffhaltige Substanz ist, die dem Harnstoff *zweifellos* sehr nahe stehen muß und sich wahrscheinlich in Harnstoff verwandeln kann. Durch Phosphorwolframsäure und Salzsäure wird diese Substanz aus dem Harne nicht gefällt. Wenn wir nun bedenken, daß der U-Stoff dem Harnstoff nicht nur nahesteht, sondern daß er tatsächlich das Harnstoffmolekül enthält, wie durch das neue Oxalat bewiesen ist, so muß der Gedanke naheliegen, daß er, der U-Stoff, die wesentlichste Ursache der Harntoxizität ist. Es ist ausgeschlossen, daß der Harn neben dem U-Stoff noch einen anderen quantitativ wichtigen Bestandteil enthält, der dem Harnstoff ganz nahe steht. Von Bedeutung in bezug auf *Werschinins* Untersuchungen ist auch der Umstand, daß der U-Stoff durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt wird[2]).

---

[1]) Diese Arbeit ist leider fast unbekannt geblieben, da sie schwer zugänglich ist; sie erschien in den Berichten aus der Universität zu Tomsk 1904.

[2]) Hingegen werden die Farbstoffe des Urins (Urochrom) durch diese Säure gefällt.

Eine einfache Methode zur Blutentnahme bei der Hagedorn-Jensenschen Blutzuckerbestimmung.

Von

Gustav Fritz und B. Paul.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Pázmány-Peter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 2. April 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Unter den in letzteren Jahren sich verbreitenden Blutbestimmungsmethoden scheint die *Hagedorn-Jensen*sche die *Bang*sche Methode durch ihre Einfachheit und große Präzisität immer mehr zu verdrängen. Nach den mittels der *Bang*schen Methode gewonnenen über 1000 und der *Hagedorn-Jensen*schen Methode erhaltenen einigen 100 Resultaten stimmen wir auch jedenfalls letzterer zu, da diese Methode durch ihre Einfachheit und Genauigkeit statt der viel Zeit raubenden und große Reinlichkeit erfordernden *Bang*schen Methode viel geeigneter ist zu Laboratoriums- und klinischen Arbeiten. Seit aber in dieser Zeitschrift diese Methode beschreibende Berichte[1]) erschienen sind, besprachen mehrere ihre Vorzüge vor der *Bang*schen, es entstanden nur betreffend der Blutentnahme Differenzen zwischen den verschiedenen Autoren. *Dresel* und *Rothmann*[2]) empfehlen, daß statt der in den Originalberichten beschriebenen Methode, welche eine 0,1-ccm-Pipette vorschreibt, die Blutentnahme mittels des bei der *Bang*schen Methode bekanntgemachten Papieres geschehe, weil bei der Benutzung der Pipetten das Resultat durch die Gerinnung, das Zurückrinnen und das schwere Herausschwenken des Blutes aus der Pipette sehr unzuverlässig wird. Sie und *Dingemanse*[3]) halten die Resultate, die durch das Papierverfahren gewonnen sind, ebenso präzis wie jene, die mittels der Pipetten geschahen. Dagegen fanden *Diaz C. Jimenez* und *Sanchez Cuenca*[4]) die Papiermethode für unbrauchbar infolge der

---

[1]) Diese Zeitschr. **135**, **137**.
[2]) Ebendaselbst **146**.
[3]) Ebendaselbst **154**.
[4]) Ebendaselbst **153**.

durch dieselbe erhaltenen zweifelhaften Ergebnisse, welche nach ihrer Auffassung dadurch entstehen, daß die auf dem Papier wegen des Eiweißniederschlages auftretenden Blutgerinnsel Zucker zurückhalten. Wir unsererseits nahmen das zu der *Bang*schen Methode gebrauchte Blut jederzeit mit einer Pipette, und zwar mit einer, die *Ernst* und *Weiss* beschrieben haben[1]). Da wir das Verfahren in jedem Falle anwendbar fanden, gebrauchten wir es mit einigen Modifikationen zur *Hagedorn-Jensen*schen Methode. Wir fanden die Vorteile des Papierverfahrens auch dann nicht, wenn die Resultate tadellos waren, und da man dazu nicht viel weniger Blut gebraucht als 0,1 ccm. Ein weiterer Nachteil der Methode ist, daß man zu ihr eine Torsionswage benötigt und dieser Apparat nicht jedem Institut zur Verfügung steht und seine Beschaffung bei der heutigen schweren finanziellen Lage recht kostspielig ist.

Wir empfehlen zur *Hagedorn-Jensen*schen Methode das folgende einfache Verfahren, mit welchem wir die entstandenen Meinungsverschiedenheiten der Blutentnahme überbrücken zu können glauben. Dies geschieht mit einer einfach konstruierten Pipette (*G. Fritz*).

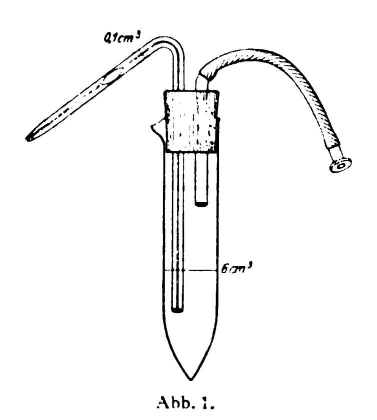


Abb. 1.

In ein mit einem Ausguß versehenes dickwandiges Zentrifugenröhrchen kommt ein Gummipfropfen, welcher unter den Ausguß des Röhrchens reicht. Durch den Gummipfropfen gehen zwei Glasröhren, von welchen das eine kurz, an seinem äußeren Ende mit einem Gummischlauch und darangesetzten Mundstück versehen ist, das andere eine gebogene Kapillare, dessen mittlere Partie zu einer Ampulle erweitert und auf 0,1 ccm geeicht ist und beinahe bis an den Grund des Zentrifugenröhrchens reicht. Es ist an den Zentrifugenröhrchen ein Zeichen für genau 6 ccm Inhalt angebracht. Die Blutentnahme geschieht so, daß durch den Gummischlauch in die Pipette bis zur Marke Blut gesaugt wird; es ist ratsam, das Blut ein wenig über die Marke zu ziehen und dann mit einer am Ende der Pipette gehaltenen Watte das überflüssige Blut bis zur Eichung herunterzuziehen. Nun saugt man das Blut in das Zentrifugenröhrchen und zieht durch die Kapillare ins Röhrchen so lange von der Fällungsflüssigkeit nach (5 ccm 0,45proz. $ZnSO_4$ + 1 ccm n/10 NaOH), bis jene ausgewaschen ist und die Lösung im

[1]) Wien. klin. Wochenschr. 1921.

Zentrifugenröhrchen bis nahe zur 6-ccm-Eichung reicht. Nach dem Entfernen des Pfropfens wird der untere Teil der Pipette mit einigen Tropfen Fällungslösung abgeschwenkt und danach bis zur Marke aufgefüllt. Nachher kommt das 3 Minuten lang dauernde Kochen im Zentrifugenröhrchen, wonach man das Koagulum auf zweierlei Weise entfernen kann: entweder so, daß man nach der Originalvorschrift filtriert, oder aber, daß man 3 Minuten lang mit etwa 2000 Drehungszahlen zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird vom Zentrifugat abgegossen und das Zentrifugenröhrchen zweimal je mit 3 ccm destillierten Wassers nachgewaschen und mit einigen Schwüngen wieder zentrifugiert, wonach man das Waschwasser zu der zuerst abgeschütteten Flüssigkeit dazu gibt. Sind die Pipetten genau kalibriert, erreicht man tadellose Resultate. Das Einstocken des Blutes in der Pipette kam durch die schnelle Handhabung der Blutentnahme niemals vor.

Die Aufnahmefähigkeit von Lipoidgemischen.

Von

A. Schäfer.

(Aus der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 2. April 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Seitdem man weiß, daß die Zelle ein heterogenes System ist, müssen für die Verteilung von Stoffen in Zellen und Organen im besonderen zwei physikalisch-chemische Vorgänge in Betracht gezogen werden: selektive Löslichkeit und Adsorption. Während über den letzteren Vorgang durch viele Autoren, namentlich *L. Michaelis*, *P. Rona* und *H. Freundlich*, für die Lipoide auch durch *S. Loewe*, ein größeres experimentelles Material herbeigeschafft worden ist, sind die Vorgänge in echten Lösungen relativ weniger untersucht, und doch spielt die Frage der Löslichkeit, namentlich bezüglich der Lipoide, in der Physiologie und besonders in der Pharmakologie eine große Rolle.

Im folgenden wird deshalb kurz über Versuche berichtet, bei denen die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Phasen untersucht wurde. Die eine Phase bestand aus Äther bzw. Benzol oder Öl, die andere aus Wasser. Es wurde die Verteilung eines Stoffes (Ferrirhodanid) zwischen der wässerigen Phase einerseits und andererseits zwischen den genannten nicht wässerigen Phasen teils für sich, teils in Gemischen von ihnen untersucht. Es handelte sich hauptsächlich darum, *ob die einzelnen Komponenten einer Lipoidphase sich in ihrem Lösungsvermögen gegenseitig beeinflussen.*

II. Methodik.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß wässerige Lösungen von Eisenrhodanid bekannten Gehalts mit Äther, Benzol und Öl geschüttelt und die dadurch verursachte Änderung im Eisengehalt der

wässerigen Phase auf kolorimetrischem Wege festgestellt wurde. Aus der Differenz des Eisengehalts der Ausgangslösung und der mit den oben genannten Stoffen geschüttelten Lösung ergaben sich die durch Verteilung entstandenen Eisenwerte der nicht wässerigen Phase. Wegen der Veränderlichkeit der Eisenrhodanidfarbe ist auf sorgfältigste Gleichhaltung der Bedingungen und exaktestes schnelles Arbeiten zu achten.

Angewandte Lösungen.

Äthergesättigte Rhodaneisenlösungen.

Lösung	A =	1,410 mg	Eisen	in	50 ccm
„	B =	1,110 „	„	„	50 „
„	C =	0,750 „	„	„	50 „
„	D =	0,360 „	„	„	50 „

III. Versuche.

A. System Äther und Benzol.

1. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 15 ccm Äther.

2. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 15 ccm Benzol.

3. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 7,5 ccm Äther + 7,5 ccm Benzol.

Die gut verschlossenen Proben der drei Versuchsreihen wurden 15 Minuten lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt und zusammen mit den Ausgangslösungen 24 Stunden in den Eisschrank gestellt.

Man kann annehmen, daß sich innerhalb dieser Zeit ein bestimmtes Gleichgewicht in der Verteilung einstellt, da es auch beim Wiederholen dieses Modellversuchs unter denselben Bedingungen ebenfalls wieder erreicht wurde.

Hierauf wurde das wässerige Lösungsmittel abpipettiert, mit verdünnter Salzsäure zur Zurückdrängung der Dissoziation angesäuert (1 ccm 2n Salzsäure auf 15 ccm Lösung) und durch Vergleich im Kolorimeter mit den ebenfalls angesäuerten Ausgangslösungen der Eisengehalt festgestellt.

Da wir bei den Versuchsreihen 1 und 2 doppelt soviel der einzelnen organischen Lösungskomponenten angewandt haben als bei 3, müssen wir, wenn wir 1 und 2 mit 3 in Beziehung bringen wollen, die Hälfte der gefundenen Eisenwerte von 1 und 2 in Rechnung bringen bzw. sie addieren. Die unten folgenden Zahlen sind Mittelwerte zweier gut miteinander übereinstimmender Versuchsreihen. Unter C_w, C_a, C_b und C_{a+b} wird die Konzentration an Eisen in den Lösungsmitteln Wasser, Äther, Benzol und Äther + Benzol verstanden. $C_{w\ (Ausg.)}$

ist die Konzentration an Eisen in der unbehandelten Ausgangslösung. Die Eisenwerte sind in Milligrammen angegeben und beziehen sich bei $C_{w\,(Ausg.)}$ und C_w auf 50 ccm, bei C_a und C_b auf 7,5 ccm und bei C_{a+b} auf 15 ccm Lösungsmittel. Nimmt man an, daß die Verteilung von Eisen bzw. Eisenrhodanid auf die Phase Benzol + Äther eine additive Größe der einzelnen Komponenten ist, so erhält man durch Berechnung die Werte der Versuchsreihe 3a.

Tabelle I.

System Äther und Benzol.

Versuchsreihe 1.

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	C_a	$\frac{C_w}{C_a}$
A	1,41	1,02	0,39	2,61
B	1,11	0,81	0,30	2,70
C	0,75	0,56	0,19	2,94
D	0,36	0,25	0,11	2,27

Versuchsreihe 2.

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	C_b	$\frac{C_w}{C_b}$
A	1,41	1,41	0,00	∞
B	1,11	1,11	0,00	∞
C	0,75	0,75	0,00	∞
D	0,36	0,36	0,00	∞

Versuchsreihe 3 (gefunden).

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	C_{a+b}	$\frac{C_w}{C_{a+b}}$
A	1,41	1,22	0,19	6,42
B	1,11	1,02	0,09	11,34
C	0,75	0,71	0,04	17,75
D	0,36	0,33	0,03	11,00

Versuchsreihe 3a (berechnet).

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	C_{a+b}	$\frac{C_w}{C_{a+b}}$
A	1,41	1,02	0,39	2,61
B	1,11	0,81	0,30	2,70
C	0,75	0,56	0,19	2,94
D	0,36	0,25	0,11	2,27

Zur besseren Übersicht über die Bedeutung dieser Zahlen sind die unter C_w stehenden Werte aller Versuchsreihen (Konzentration an Eisen in der wässerigen Phase) in ein Koordinatensystem eingetragen

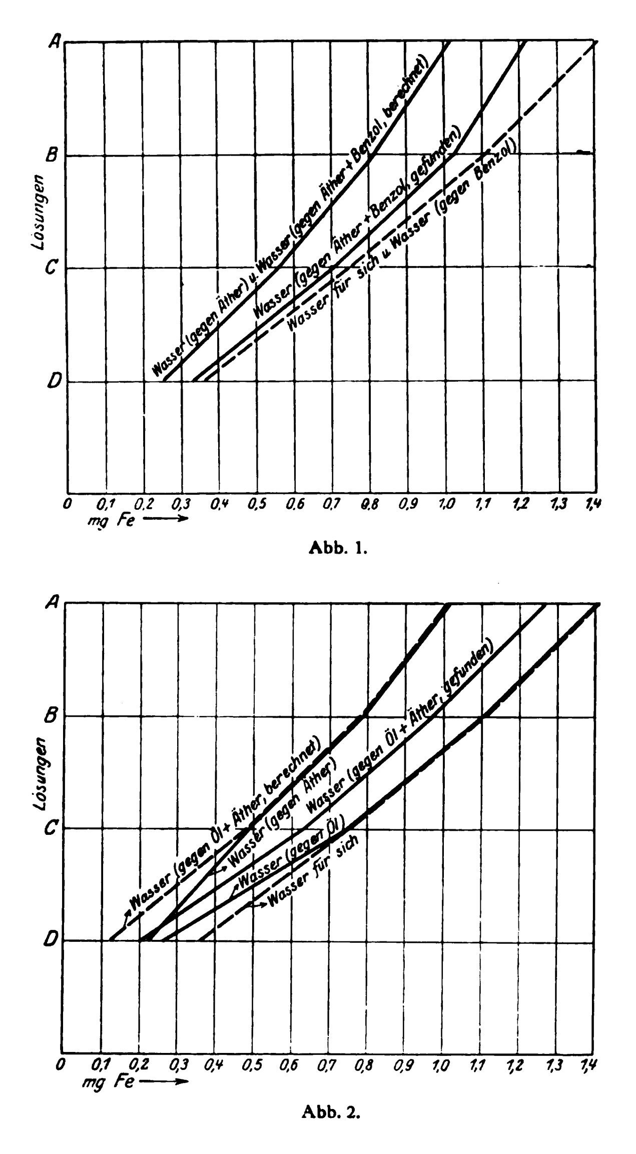


Abb. 1.

Abb. 2.

worden. Eine Konstanz des Verteilungsfaktors ist nur bei den drei ersten Lösungen der Versuchsreihen 1 und 3a vorhanden. Eigentümlich für alle Versuchsreihen ist die Abnahme des Teilungsfaktors (Wasser

:organischem Lösungsmittel) bei der Lösung mit der geringsten Eisenkonzentration D. Das würde heißen, daß in diesem Falle das organische Lösungsmittel bei der Verteilung bevorzugt würde, relativ mehr ins organische Lösungsmittel geht, d. h. der lipoidlösliche Zustand begünstigt ist.

Am meisten interessiert uns die aus den Zahlen hervorgehende starke Abweichung der gefundenen Teilungsquotienten, von den unter der Annahme einfacher Additivität berechneten, wie sie unter 3a angegeben sind. Durch Zusatz von Benzol wird die Aufnahmefähigkeit des Äthers weit stärker herabgesetzt, als es aus den relativen Löslichkeiten des Systems Äther und Wasser einerseits und Benzol + Wasser andererseits zu erwarten gewesen wäre, d. h. die *Lösungsfähigkeit, das Lösungsvermögen des einen Stoffes (Äther) für Eisen, wird durch die Anwesenheit eines zweiten (Benzol) stark herabgesetzt.*

B. System Äther und Öl.

Bei der Ausführung dieses Modellversuchs wurde im großen und ganzen genau wie beim vorhergehenden Versuche verfahren. Einige Schwierigkeiten entstehen bei Verwendung von Öl (reinstem neutralen Olivenöl). Wenn man das Öl als Lösungsmittel der wässerigen Eisenrhodanidlösung zugesetzt hat und auf der Maschine schüttelt, erhält man eine feine Emulsion, bei der nur langsam eine Entmischung der beiden Flüssigkeiten eintritt. Es ist daher ratsam, das Schütteln mit der Hand vorzunehmen, auch empfiehlt es sich nicht, die Proben in den Eisschrank zu stellen. Die kleinen Schwankungen der Zimmertemperatur sind freilich auf die Einstellung des Gleichgewichts nicht ohne Einfluß. Wir haben sie aber absichtlich in Kauf genommen und auf die Anwendung eines Thermostaten verzichtet, denn es zeigte sich bald, daß, wenn auch die Zahlen der einzelnen Reihen voneinander abweichen, der Gesamtcharakter der Versuche der gleiche blieb und das Gesamtresultat unabhängig von der Temperatur ist. Das zeigt z. B. ein Vergleich der Werte der Versuchsreihe der Tabelle I mit denen der Versuchsreihe 1 in Tabelle II. Wir haben in beiden Fällen denselben Versuch, nur unter verschiedenen Bedingungen von Temperatur und Zeit ausgeführt. Die Versuchsreihen in Tabelle I wurden bei 0° 24 Stunden und die Versuchsreihen in Tabelle II bei 18° 2 Stunden stehengelassen.

1. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 15 ccm Äther.

2. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 15 ccm Öl.

3. Versuchsreihe: je 50 ccm der Lösungen A, B, C, D + 7,5 ccm Äther + 7,5 ccm Öl.

Die Lösungen wurden 15 Minuten geschüttelt und dann 2 Stunden bei Zimmertemperatur (18°) stehengelassen. Hierauf wurde abpipettiert und in üblicher Weise der Gehalt an Eisen in den einzelnen Lösungsmitteln festgestellt.

Tabelle II.

System Äther und Öl.

Versuchsreihe 1.

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	C_a	$\frac{C_w}{C_a}$
A	1,41	1,02	0,39	2,61
B	1,11	0,79	0,32	2,46
C	0,75	0,49	0,26	1,88
D	0,36	0,22	0,14	1,57

Versuchsreihe 2.

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	$C_ö$	$\frac{C_w}{C_a}$
A	1,41	1,41	0,00	∞
B	1,11	1,11	0,00	∞
C	0,75	0,75	0,00	∞
D	0,36	0,26	0,10	2,60

Versuchsreihe 3 (gefunden).

Lösungen	C_w (Ausgangslösung)	C_w	$C_{a+ö}$	$\frac{C_w}{C_{a+ö}}$
A	1,41	1,27	0,14	9,07
B	1,11	0,97	0,14	6,92
C	0,75	0,63	0,12	5,25
D	0,36	0,20	0,16	1,25
Versuchsreihe 3a (berechnet).				
A	1,41	1,02	0,39	2,61
B	1,11	0,79	0,32	2,46
C	0,75	0,49	0,26	1,88
D	0,36	0,12	0,24	0,50

Es ergibt sich dasselbe Resultat wie beim Modellversuch mit Benzol. Die Abweichung der Werte der relativen Löslichkeiten in der Versuchsreihe 3 von denen in der Versuchsreihe 3a kommt auch bei dieser Versuchsanordnung wieder zum Ausdruck. Es geht viel weniger Eisen in die ätherische Schicht, wenn gleichzeitig Öl vorhanden ist, das Öl mindert die Menge des Eisens, die sonst von der gleichen Menge Äthers aufgenommen worden wäre.

IV.

Physikalisch-chemisch lassen sich die beobachteten Erscheinungen durch die Annahme beschreiben, daß zwischen den einzelnen Komponenten einer Lösung eine gegenseitige Affinität zur Geltung kommen

kann, daß also neben interphasischen auch intraphasische Kräfte wirksam sind. Das Vorhandensein solcher Affinität gerade in Lipoidlösungen, allgemein in *nicht wässerigen Lösungsmitteln*, zeigen auch andere neuere Untersuchungen, z. B. die von *A. Hantzsch* oder die von *N. W. Kondyrew*, der die überraschende Tatsache gefunden hat, daß organische Metallverbindungen wie die des Magnesiums in ätherischen Lösungen ionisiert sind. Solche zwischen den einzelnen Komponenten eines Lipoidsystems wirkenden Kräfte sind auch für das sogenannte antagonistische bzw. synergistische Verhalten heranzuziehen, das bei einzelnen Lipoiden, z. B. Cholesterin und Lecithin, eine biologisch wichtige Rolle spielt. Damit gewinnen die obigen Modellversuche Beziehungen zu wichtigen Problemen der allgemeinen Biologie, z. B. zum Permeabilitätsproblem, und auch für die von *P. Ehrlich* studierte Änderung der Rezeptorenfunktion der Zelle dürfte eine solche gegenseitige Beeinflussung der Lipoidkomponenten ceteris paribus in Betracht kommen.

Literatur.

K. Glenz, Helv. chim. act. **6**, 826, 1923. — *E. A. Hafner* und *L. Kürthy*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **104**, 148, 1924 (Literatur). — *A. Hantzsch*, Berl. Ber. **58**, 633, 1925. — *N. W. Kondyrew*, ebendaselbst **58**, 459, 1925. — *S. Loewe*, I bis IV, diese Zeitschr. **42**, 150, 190, 205, 207, 1912. — *K. Spiro*. Klin. Wochenschr. **1**, 1199, 1922. Pflügers Arch. **205**, 15, 1924.

Über den Wert der Nitroprussidnatriumprobe für den Nachweis und die Bestimmung des Totalacetons im Harn und in gewissen anderen Körperflüssigkeiten.

Von

N. O. Engfeldt.

(Aus der Tierärztlichen Hochschule zu Stockholm.)

(Eingegangen am 3. April 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Schon 1883 wurde das Nitroprussidnatrium von *Legal* als Reagenz für den Nachweis der Acetonurie eingeführt. Seitdem ist die *Legal*sche Methode sowohl der Kritik als auch Umarbeitungen verschiedentlich unterzogen worden. Trotzdem umgibt dieses Verfahren eine gewisse Unklarheit sowohl betreffs der Zuverlässigkeit als auch der Empfindlichkeit. Deshalb erscheint mir eine Klarlegung dieser Fragen wünschenswert.

Im Anschluß an die Prüfung einer der Modifikationen der *Legal*schen Probe werde ich auch eine bequeme, zum klinischen Gebrauch bestimmte approximative Methode, den Gesamtacetongehalt im Urin festzustellen, vorlegen.

Diskussion über frühere Untersuchungen.

Wie erwähnt, legte *Legal* bereits 1883 das nach ihm später benannte Verfahren vor, mit Hilfe des Nitroprussidnatriums Aceton im Urin nachzuweisen. Die *Breslauer ärztliche Zeitung* vom genannten Jahre, in der die Originalabhandlung vorliegt, ist in unserer schwedischen öffentlichen Bibliothek leider nicht zugänglich. Ich bin deshalb auf das gleichzeitig von *Hofmeister*[1]) veröffentlichte Referat derselben angewiesen.

Selbst ein flüchtiger Überblick seines Inhalts zeigt, daß die jetzige Anwendungsweise der Probe — Essigsäurezusatz zu dem mit Alkali und

---

[1]) *Hofmeister*, Zeitschr. f. anal. Chem. 22, 464, 1883.

Nitroprussidnatrium versetzten Urin — mit *Legals* ursprünglicher Vorschrift übereinstimmt.

Seitdem sind verschiedene Modifikationen angewandt worden, jedoch mit Ausnahme der von *Rothera*[1]) angegebenen Variante sind diese Modifikationen keine Verbesserungen der *Legal*schen Probe, sondern eher das Gegenteil. Diese Behauptung stützt sich auf eine von mir ausgeführte experimentelle Untersuchung, deren Einzelheiten kaum von Interesse sind, und auf die ich deshalb nicht eingehe. Im Prinzip war der Gang der Untersuchung der, daß Lösungen von Aceton bzw. Acetacetat, die deutlichen, aber schwach positiven Ausschlag für die *Legal*sche Probe gaben, in Übereinstimmung mit den Vorschriften der Modifikationen geprüft wurden.

Legal hebt, dem angeführten Referat gemäß, die Zweckmäßigkeit hervor, bei stark gefärbten Urinen die Probe im Urindestillat auszuführen, ferner soll die Grenze für die Empfindlichkeit der Probe bei einem Acetongehalt von 0,015 Proz. liegen. Die Acetessigsäure soll nur halb so empfindlich wie Aceton sein. Diese spätere Behauptung steht jedoch im Widerspruch mit einer anderen desselben Verfassers, nämlich daß die Probe mit Acetessigsäure bei so geringen Mengen wie 0,01 Proz. gelingen soll. Hierbei setzt der Verfasser allerdings voraus, daß die Acetessigsäure zunächst durch Ausschütteln mit Äther in weinsäurehaltiger Lösung isoliert wird. *Legals* Ansicht betreffs der geringeren Empfindlichkeit der Acetessigsäure gegenüber dem Nitroprussidnatrium ist jedoch als Irrtum zu betrachten. In der Tat gibt die Acetessigsäure nach späteren Erfahrungen ein vielfach farbenstärkeres Reaktionsprodukt als das Aceton.

1910 zeigte nämlich *Denigès*[2]), daß die nach *Legal* ausgeführte Nitroprussidnatriumreaktion wohl mit Sicherheit den Nachweis von 0,25 g Aceton pro Liter Urin gestattet, aber daß die genannte Reaktion bezüglich der Acetessigsäure 16- bis 18mal so empfindlich ist. Der Umstand, daß die Acetessigsäure, auch nach der damaligen Auffassung, die quantitativ vorherrschende der im Urin vorhandenen Körper ist, die den sogenannten Gesamtacetongehalt bilden, veranlaßte *Denigès*, der *Legal*schen Probe großen klinischen Wert beizumessen.

Dieser Auslassung *Denigès'* glaube ich folgendes hinzufügen zu müssen: *Die Legalsche Probe soll stets direkt im Urin, nicht im Urindestillat ausgeführt werden*, und zwar aus dem Grunde, weil die Acetessigsäure bei der Destillation in Aceton zerfällt. Da nun — wie es in der Tat der Fall ist — die Acetessigsäure in frischem Urin auf etwa 90 Proz. des sogenannten Gesamtacetons geschätzt werden kann, so ist ohne weiteres ersichtlich, daß das Destillat im allgemeinen eine wesentlich schwächere Reaktion für *Legal* als der Urin selbst geben dürfte.

Eine Beobachtung von ähnlicher Bedeutung, wie diejenige von *Denigès*, wurde verschiedene Jahre später von *Lenk* und *Hahn*[3]) gemacht. Diese Forscher fanden nämlich — sicher ohne Wissen von *Denigès'* früherer Erfahrung — daß Nitroprussidnatrium wesentlich kräftiger mit Acetessigsäure als mit Aceton reagiert. Nach ihren Angaben soll das mit Acetessigsäure erhaltene Reaktionsprodukt von 5,55mal so großer Farbenstärke sein. Die *Lenk-Hahn*sche Ziffer ist, nebenbei gesagt, *viel zu niedrig.*

---

[1]) *Rothera*, Journ. of Physiol. **37**, 491, 1908.

[2]) *Denigès*, C. r. soc. biol. **68**, 487, 1910.

[3]) *Lenk* und *Hahn*, Münch. med. Wochenschr. **64**, 179, 1917.

Trotz *Denigès'* und *Lenk-Hahns* Beobachtungen findet man in unseren Handbüchern über Urologie[1]) stets die Angabe, daß die *Legal*sche Probe am besten im Urindestillat ausgeführt werden soll. Daß diese Anweisung als Fehlzeig zu betrachten ist, geht ohne weiteres aus dem soeben Angeführten hervor.

Die *Legal*sche Probe ist zweifellos auch in ihrer ursprünglichen Form eine der bequemsten und zuverlässigsten klinischen Proben auf Acetonstoffe, die uns zurzeit zur Verfügung steht. Wie vor kurzem hervorgehoben, können den zahlreichen Modifikationen mit Ausnahme der *Rothera*schen keine wirklichen Vorzüge zuerkannt werden. Eine beachtenswerte Einzelheit für sämtliche Modifikationen liegt darin, daß die Reaktion in ammoniakalischer[2]) Lösung stattfinden darf. *Rothera* kommt jedoch das Verdienst zu, die Bedeutung hierbei entdeckt zu haben, welche die Anwesenheit *größerer* Mengen an Ammoniumsalzen für die Empfindlichkeit der Probe besitzt. *Rotheras* Modifikation gemäß wird Acetonurie dadurch nachgewiesen, daß man zu 5 bis 10 ccm Urin ein Ammoniumsalz in Substanz zusetzt, darauf 2 bis 3 Tropfen einer 5proz. frischen Nitroprussidnatriumlösung und schließlich 1 bis 2 ccm konzentrierten Ammoniaks. Bei Anwesenheit von Aceton in pathologischer Menge entsteht eine charakteristische permanganatähnliche Farbe. Bei geringen Mengen Aceton tritt die Reaktion ziemlich langsam ein. Deswegen soll die Beobachtungszeit bis zu ½ Stunde ausgedehnt werden. Das Ammoniumsalz soll in so großem Überschuß vorhanden sein, daß die Reaktionsmischung mit der genannten Substanz voll gesättigt wird.

Rothera gibt weiter an, daß die Grenze der Empfindlichkeit der Probe bei einer Konzentration von 1 g Aceton auf 600 ccm Wasser liegt. Meine später angeführten Versuche zeigen jedoch, daß die Empfindlichkeit wesentlich größer ist.

Schon 1884 war *Le Nobel*[3]) der bedeutendsten Einzelheit in *Rotheras* Probe auf der Spur. Er hebt nämlich hervor, daß die Empfindlichkeit der *Legal*schen Probe gesteigert wird, wenn man bei Ausführung der Probe

---

[1]) Die in den meisten Handbüchern zu findende Angabe, daß Nitroprussidnatriumlösung frisch bereitet sein muß, ist weniger begründet. Nitroprussidnatrium ist in wässeriger Lösung fast unbegrenzt haltbar, vorausgesetzt, daß die Lösung in einer Flasche von braunem Glas aufbewahrt und nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt wird. Eine derartige, im Frühjahr 1921 von mir bereitete Lösung zeigte sich am Schlusse vorigen Jahres (1924) voll anwendbar. Irgendeine Änderung in der Farbe und im Aussehen konnte im übrigen nicht wahrgenommen werden.

Daß die zur Ausführung der *Legal*schen Probe nötige Nitroprussidnatriumlösung nicht frisch bereitet zu sein braucht, ist früher von mehreren Forschern, wie *Lenk* und *Hahn*, *Trunkel* (Pharm.-Ztg. **63**, 104, 1918), *Bohrisch* (Pharm.-Ztg. **63**, 173, 1918) hervorgehoben worden. Trotz dieser zahlreichen Behauptungen macht sich weiterhin die Ansicht geltend, daß die Nitroprussidnatriumlösung von geringer Haltbarkeit sei und man für die Ausführung der *Legal*schen Probe eine frisch bereitete benötige. Es wäre wünschenswert, daß dieser Irrtum in Zukunft aus der Literatur verschwinden würde.

[2]) *Rimini* wendet Äthylendiamin an. (Annali di Farmacoterapie e Chem. 1898, S. 193; ref. nach dem Chem. Centralbl.)

[3]) *Le Nobel*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **18**, 6, 1884.

die Veränderung vornimmt, das Alkalihydroxyd gegen Ammoniak auszutauschen, und dann eine für dessen Neutralisation *unzureichende* Menge Essigsäure zusetzt. In diesem Zusammenhang mache ich darauf aufmerksam, daß die Reaktionsmischung bei dem genannten Verhalten Ammoniumsalz samt Ammoniak im Überschuß enthält. *Rotheras* Probe findet im Prinzip unter gleichen Verhältnissen statt.

Rothera betont ferner, daß auch die Wahl des Ammoniumsalzes für das Gelingen der Probe von Bedeutung ist. Vor allem zeigte sich das Sulfat vorteilhaft. Auch das Chlorid, Bromid, Acetat und Carbonat erwiesen sich anwendbar. Das Nitrat gab nicht denselben quantitativen Effekt, das Oxalat zeigte sich ungeeignet. Die Bedeutung, welche die Anwesenheit von Ammoniumsalz besitzt, geht aus der folgenden, aus *Rotheras* Arbeit entnommenen Zusammenstellung hervor:

Tabelle I.

	H_3N	$H_3N + (H_4N)_2SO_4$
Aceton . . .	Rothera (nicht empfindlich bei Konzentration $^1/_{1000}$)	Permanganatgefärbt (sehr empfindlich bei Konzentration $^1/_{20\,000}$)
Acetessigsäure	Orangerot	Orangerot

Eine besonders bemerkenswerte Einzelheit in *Rotheras* oben angeführtem Versuch besteht darin, daß er mit Acetessigsäure eine ganz andere Farbe als mit Aceton erhalten hat, nämlich eine orangerote.

Falls Acetessigsäure wirklich ein orangerotes Reaktionsprodukt geben sollte, müßte man eine Farbe in Orangerot bei direkter Anwendung der Probe mit Urin erhalten, und zwar deswegen, weil der Acetessigsäuregehalt vorherrschend ist. Bei Anwendung der Probe mit „acetonhaltigem" Urin bekommt man niemals orangerote, sondern nach allgemeiner Erfahrung stets permanganatviolette Farbe. *Rotheras* Angabe, daß die Probe mit Acetessigsäure orangerote Farbe gibt, ist in der Tat falsch. Wohl gibt der *Äthylester* eine solche Farbe, aber mit Acetessigsäure selbst oder richtiger deren Salzen erhält man eine permanganatviolette Farbe, identisch mit derjenigen, die man aus Aceton bekommt, obwohl wesentlich farbenstärker. Ferner sei betont, daß Aceton wesentlich langsamer als Acetessigsäure reagiert. Erst nach $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde, unter anderem auf der vorhandenen Temperatur beruhend, erreicht die „Acetonprobe" ihre höchste Farbenstärke. Dieses trifft betreffs der Acetessigsäure schon in 10 Minuten ein. In beiden Fällen verschwindet die violette Farbe allmählich und geht in eine gelbe mit Stich ins Grüne über — die „Acetessigsäureprobe" nach etwa 1 Stunde, die „Acetonprobe" nach etwa 3 Stunden. Unter Hinweis auf das Vorhergehende und das Verhalten, daß die Acetessigsäure bei der praktischen Anwendung der Probe mit frischem Urin die vorherrschende ist (etwa 90 Proz.), glaube ich die Beobachtungszeit auf 10 Minuten einschränken zu müssen. Dieses ist vor allem bei einer quantitativen Bestimmung der Farbenstärke von großer Wichtigkeit.

Die Modifikationen der *Legal*schen Nitroprussidnatriumprobe, welche inzwischen angegeben wurden, sind im allgemeinen aus zufälligen Beobachtungen hervorgegangen. Seltener sind als Beleg für die Be-

rechtigung oder den Vorteil einer gewissen Modifikation Versuche solchen Umfanges angeführt worden, daß dieselben als systematische betrachtet werden können. Wenn dieses einmal geschah, wurde als Untersuchungsmaterial im allgemeinen Aceton angewandt, während man die Acetessigsäure ganz beiseite ließ. Möglicherweise hängt dieses mit einer falschen Auffassung betreffs der Haltbarkeit der Acetessigsäure oder richtiger deren Salze in wässeriger Lösung zusammen, die sich bei vielen auch weiterhin geltend macht. Das im Urin vorkommende Acetacetat würde also sehr schnell in Aceton zerfallen, und deshalb hätte man vom analytischen Gesichtspunkt hauptsächlich mit Aceton zu tun. Gewiß hat *Ceresole*[1]) bereits 1882 gezeigt, daß die Alkali- und Bariumsalze der Acetessigsäure in wässeriger Lösung eine ziemlich große Haltbarkeit bei der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur besitzen. Diese Beobachtung scheint jedoch der Vergessenheit anheimgefallen zu sein. Ich selbst[2]) zeigte schon vor einigen Jahren, daß das im Urin vorkommende Acetacetat sehr langsam bei Zimmertemperatur gespalten wird. Nach 24 Stunden erreichte der Zerfall einige wenige Prozente. Da außerdem der Acetacetatgehalt in frischem Urin, wie bereits hervorgehoben, etwa 90 Proz. des sogenannten Gesamtacetons ausmacht, leuchtet die Notwendigkeit völlig ein, bei einer experimentellen Erforschung der Anwendbarkeit und Empfindlichkeit der Nitroprussidnatriumprobe und andere hiermit im Zusammenhang stehende Fragen nicht nur auf das Aceton, sondern vor allem die Acetessigsäure zu erstrecken.

Experimenteller Teil.

Als Material bei den Versuchen, die zu dem soeben genannten Zwecke ausgeführt wurden, diente teils eine reine Acetonlösung, teils eine frisch bereitete Lösung von Natriumacetacetat. Die Stärke der Lösungen wurde jodometrisch bestimmt, und zwar die der ersteren direkt, die der letzteren nach vorhergegangener Destillation in schwach saurer Lösung. Die Natriumacetacetatlösung wurde durch kalte Verseifung von Acetessigester mit Natriumhydroxyd hergestellt (2,5 ccm Ester + 100 ccm 2 mol. Lauge). Nach 24stündiger Aufbewahrung neutralisierte ich die Mischung sorgfältig und schüttelte zwecks vollständiger Beseitigung unverseiften Esters wiederholte Male mit Äther aus. Durch die Lösung wurde darauf ein Luftstrom geleitet — sowohl bei gewöhnlichem Druck als auch im Vakuum —, bis die Lösung von Äther und Aceton befreit war, das sich während der Verseifung durch teilweisen Zerfall des Acetacetats gebildet hatte. Schließlich behandelte ich die Lösung bei Zimmertemperatur mit hochwertiger Tierkohle und filtrierte sie. Das Filtrat war nunmehr völlig farb- und geruchlos und ganz frei vom Ester, was später unter anderem aus der Konstanz betreffs der Jodwerte hervorging, die nach der Destillation erhalten wurde. Der Acetessigsäuregehalt ist im folgenden immer als Aceton berechnet.

[1]) *Ceresole*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **15**, 1326, 1871, 1882.

[2]) *Engfeldt*, Beiträge zur Kenntnis der Biochemie der Acetonkörper. Dissertation. Stockholm 1920.

Vergleichende Untersuchung bezüglich der Legalschen und Rotheraschen Probe.

Aus den vorher genannten Aceton- und Acetacetatlösungen bereitete ich eine Anzahl Verdünnungen, mit denen die Proben nach *Legal* und *Rothera* ausgeführt wurden. Die *Legal*sche Probe geschah hauptsächlich nach der Anweisung von *Bohrisch*[1]). Die Empfindlichkeit wächst jedoch, wenn die Nitroprussidnatriummenge weiter eingeschränkt wird. Die Probe wurde auf folgende Weise ausgeführt: 10 ccm Lösung wurden mit 2 bis 3 Tropfen 5proz. Nitroprussidnatrium samt 1 ccm 25proz. Natriumhydroxyd versetzt und *unmittelbar* danach vorsichtig mit konzentrierter Essigsäure angesäuert. Durch dieses Verfahren wird unter anderem das Volumen der Mischung eingeschränkt. Welche Bedeutung dieses hat, falls es sich um kleine Acetonkonzentrationen handelt, ist ohne weiteres klar. Mit Rücksicht auf die kurze Dauer des entstandenen Farbstoffes muß die Probe unmittelbar nach dem Essigsäurezusatz beurteilt werden. *Rotheras* Probe geschah auf folgende Weise: 10 ccm Lösung wurden mit einem gehäuften Teelöffel Ammoniumsulfat und 2 bis 3 Tropfen 5proz. Nitroprussidnatriumlösung versetzt und kräftig umgeschüttelt; darauf wurde 1 ccm 25proz. Ammoniaks [acetonfrei[2])] zugefügt und hin und wieder umgeschüttelt. Aus vorher genannten Gründen schränkte ich die Beobachtungszeit auf 10 Minuten ein. Die Resultate sind im folgenden zusammengestellt.

Tabelle II (Legal).

Acetessigsäure als Aceton berechnet mg/1000 ccm	Aceton mg/1000 ccm	Farbe
6	100	rosa, äußerst schwach
12	200	schwach rosa
24	500	schwach rubinrot
48	1000	rubinrot

Tabelle III (Rothera).

Acetessigsäure als Aceton berechnet mg/1000 ccm	Aceton mg/1000 ccm	Farbe
0,5	—	schwach rosa (Spur)
1	100	schwach rosa
1,5	—	rosa
3	200	rosa-violett
6	400	violett
12	800	„
24	—	„
48	—	„
60	—	„

[1]) *Bohrisch*, Pharm. Zentralbl. 48, 181, 1907.
[2]) *Engfeldt*, Svensk Farm. Tidskrift 20, 237, 1916.

Aus den angeführten Versuchen geht das wesentlich größere farbenbildende Vermögen der Acetessigsäure im Vergleich mit dem Aceton hervor. Die in derselben Reihe stehenden Versuche repräsentieren nämlich ungefähr ebendieselbe Farbenstärke. Durch weitere Versuche ist hervorgegangen, daß „*Legal*" ungefähr *20mal* kräftiger mit Acetessigsäure als mit Aceton reagiert, und daß „*Rothera*" ein 60 bis 70mal farbenstärkeres Reaktionsprodukt mit der ersteren gibt als mit der letzteren, vorausgesetzt, daß in letztgenanntem Falle die Beobachtungszeit bis zu 10 Minuten eingeschränkt wird. Aus den Tabellen ist ferner die Grenze für die Empfindlichkeit beider Proben ersichtlich. Betreffs der *Legal*schen Probe liegt sie für Acetessigsäure, als Aceton gerechnet, bei einer Konzentration von etwa 6 mg pro Liter, für Aceton bei 100 mg. Für *Rotheras* Probe lagen die Werte bei 0,5 bis 1 und 100 mg pro Liter. Wie bereits vorher erwähnt, reagierte *Rothera* wesentlich langsamer mit Aceton als mit Acetessigsäure. Wird beim Versuch mit Aceton nach *Rothera* die Beobachtungszeit auf etwa 1/2 Stunde ausgedehnt, erhält man schwach positiven Ausschlag auch bei einer Konzentration von 50 mg pro Liter. Schließlich bemerken wir, daß der quantitativ bedeutendste Faktor des sogenannten Totalacetons im Urin, nämlich die Acetessigsäure, etwa 10mal so intensiv mit „*Rothera*" als mit „*Legal*" reagiert. Die nach „*Rothera*" erhaltene permanganatähnliche Farbe ist außerdem im großen ganzen charakteristischer als die nach „*Legal*" erhaltene, ein Verhalten, das sich besonders bei niedrigen Konzentrationen geltend macht. Außerdem ist der nach „*Rothera*" erhaltene Farbstoff wesentlich haltbarer. Deshalb muß man der *Rothera*schen Modifikation der Probe nach *Legal* nicht nur dem Original, sondern auch dessen übrigen zahlreichen Modifikationen gegenüber den Vorzug geben, welche — wie bereits betont — eher Verschlechterungen als Verbesserungen sind.

Da zudem *Rotheras* Probe in der Ausführung ebenso einfach wie die *Legal*sche ist, verdient die erstere besonders vom klinischen Gesichtspunkt viel größere Aufmerksamkeit, als es bisher im allgemeinen der Fall gewesen zu sein scheint. Die bereits angedeutete, auf *Rotheras* Probe gegründete kolorimetrische Methode, die ich später noch beschreiben werde, erhöht in ihrer Art zweifelsohne die klinische Anwendbarkeit der *Rothera*schen Probe noch mehr.

Ich benutze die Gelegenheit, einige Beobachtungen, die mit den Voraussetzungen für die Entstehung des *Rothera*schen Farbstoffes im Zusammenhang stehen, hier mitzuteilen.

Wird Na-Acetacetatlösung (10 ccm) mit Nitroprussidnatrium (5 Tropfen 5proz.) samt konzentriertem H_3N (1 ccm) versetzt, so tritt keine typische Farbenreaktion ein. Die Mischung nimmt jedoch allmählich einen Farbenton an, welchen eine schwache, kolloidale Lösung

*

von Ferrocyankupfer aufweist. Versetzt man die Mischung innerhalb einer Stunde mit Ammoniumsulfat in Substanz, so stellt sich bald die für die *Rothera*sche Probe so charakteristische violette Farbe ein. Wird Ammoniumsulfat erst nach dreistündiger Aufbewahrung zugesetzt, erhält man auch weiter eine Farbenreaktion, obwohl nun die Farbe nicht violett, sondern blutrot wird. Versetzt man Natriumacetacetat mit Nitroprussidnatrium und Ammoniumsulfat bis zur Sättigung, so erhält man nach einer gewissen Zeit eine *äußerst schwache*, rotviolette Farbe. Die Mischung war im vorliegenden Falle neutral bis schwach sauer (Lackmus). Wenn die Mischung unmittelbar mit einer Spur verdünnter Schwefelsäure versetzt wird (schwach, aber deutlich sauer für Lackmus), bleibt jede Farbenreaktion aus. Eine solche stellt sich in beiden Fällen beim Zusatz von Alkalihydroxyd oder Ammoniak mit großer Intensität ein. Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die Voraussetzungen für positiven Ausschlag mit *Rotheras* Probe teils ammoniakalische Reaktion, teils Anwesenheit eines Ammoniumsalzes sind. Je größer die Ammoniumkonzentration ist, desto schneller und intensiver stellt sich die Reaktion ein.

In einer früheren Arbeit zeigte ich[1]), daß Na-Acetacetat in rein wässeriger Lösung von großer Haltbarkeit ist. Auch bei 37° C geschieht der Zerfall desselben in Aceton langsam [etwa 10 Proz. in 24 Stunden ($k = 0{,}0018$)]. In gesättigter Lösung von Ammoniumsulfat dagegen tritt der Zerfall wesentlich schneller ein. Schon nach 2 Stunden waren etwa 40 Proz. zerfallen ($k = 0{,}112$). Weiter glaube ich in derselben Arbeit bewiesen zu haben, daß die Ursache des wesentlich schnelleren Zerfalls hauptsächlich in der Ketisierung zu suchen ist, die durch die Anwesenheit des Ammoniumsalzes mit dem Acetacetat stattfindet. In wässeriger Lösung — inklusive Urin — kommt wahrscheinlich Acetacetat hauptsächlich in der Enolform vor. In dieser Modifikation besitzt Acetacetat eine vergleichsweise große Haltbarkeit, während dasselbe in der Ketoform — die hauptsächlich im Blute vorkommende — außerordentlich leicht der sogenannten Acetonspaltung anheimfällt. Ich wage die Ansicht zu vertreten, daß die Entstehung des violetten Farbstoffes bei der *Rothera*schen Probe in einen gewissen Zusammenhang mit der Ketisierung des Acetacetats gebracht werden kann, die in gesättigter Lösung von Ammoniumsulfat stattfindet, und zwar aus dem Grunde, *daß man das Ammoniumsalz durch andere ketisierende Stoffe ersetzen kann*, z. *B. aliphatische Aminofettsäuren und Pepton. Auch Eiweißstoffe* (Serum) weisen — wie zu erwarten war — gleichen Effekt auf, obwohl der Farbstoff im letztangeführten Falle aus bislang unbekannter Ursache nicht violett, sondern blutrot wird.

[1]) *Engfeldt*, l. c.

Die Wasserstoffexponenten der Reaktionsmischungen waren folgende:

1. 10 ccm H_2O + 8 g Ammoniumsulfat + 1 ccm 25proz. Ammoniak p_H = etwa 8.
2. 10 ccm H_2O + 1 g Alanin + 1 ccm 25proz. Ammoniak p_H = etwa 9.
3. 100 ccm H_2O + 1 g Pepton-*Witte* + 1 ccm 25proz. Ammoniak p_H = etwa 10.

Versuche nach Rothera mit normalem Urin und normalem Blut.

Aus den vorhergehenden Betrachtungen ist zweifellos die außerordentliche Empfindlichkeit, welche die Probe nach *Rothera* auszeichnet, besonders bezüglich der Acetessigsäure (etwa 1 mg/1000 ccm) ersichtlich. Die Empfindlichkeit ist in der Tat so groß, daß man allen Grund hat, selbst mit normalem Urin positives Resultat zu erwarten. Nach einer von *Scott-Wilson*[1]) ausgeführten Untersuchung geht der „Gesamtacetongehalt" in normalem Urin im Durchschnitt bis zu 2 bis 4 mg pro 24 Stunden. Zu ähnlichem Resultat bin ich selbst[2]) bei Anwendung einer ganz anderen Technik gekommen.

Bei Benutzung einer Anzahl normaler, „zufälliger" Urine (keine Tagesmengen) hat es sich ebenfalls gezeigt, daß dieselben mit *Rothera* oft[3]) positives Resultat ergeben. Man erhält eine ziemlich schwache, mehr in Rosa als Violett gehende Farbe. Wesentlich deutlicher und charakteristischer wird die Farbe, wenn das Reaktionsgemisch vor der Beurteilung filtriert wird.

Mit Rücksicht auf das soeben Angeführte soll bei der Durchführung der Probe nach *Rothera* folgendes Verfahren angewandt werden. Zu 10 ccm Urin setzt man einen großen Teelöffel (8 bis 10 g) reines Ammoniumsulfat, 5 Tropfen 5proz. Nitroprussidnatrium und 1 ccm 25proz. Ammoniak. Nach etwa 5 Minuten langer Umschüttelung wird die Mischung auf das Filtrum gebracht. Man beurteilt die Probe nach 9 bis 10 Minuten, von dem Augenblick an gerechnet, in welchem das Ammoniak zugesetzt wird. Das Auftreten einer deutlich permanganatähnlichen, violetten Farbe soll als sicherer Beweis für einen über das Normale gesteigerten Gehalt an Acetonkörpern im Urin gelten. Eine schwache, mehr ins Rosa gehende Farbennuance ist bedeutungslos, da dieselbe, wie vorher genannt, nur den normalen Gehalt des Urins

---

[1]) *Scott-Wilson*, *Journ.* of Physiol. **42**, 444, 1911.

[2]) *Engfeldt*, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 30, 1915.

[3]) Während 24 Stunden wechselt nach *Scott-Wilson* der Acetongehalt im Urin recht bedeutend. Dieses führe ich als Erklärung dafür an, daß man bei der sogenannten zufälligen Urinprobe mit „*Rothera*" nicht immer positives Resultat erhält.

an Acetonkörpern widerspiegelt. (Durch eine Anzahl von Versuchen mit normalen Urinen soll sich der Analytiker Kenntnis über die Variationen betreffs der Farbenstärke verschaffen, die man mit solchem Urin erhält.)

Die Probe ist im übrigen nicht nur für den Nachweis von Acetonkörpern im Urin anwendbar, sondern innerhalb gewisser Grenzen auch für den Nachweis genannter Körper in Blut und Milch, eventuell in anderen Körperflüssigkeiten[1]). Bei Anwendung der Probe in letztgenanntem Falle werden die Proteinstoffe beim Ammoniumsulfatzusatz ausgefällt. Nach Filtrierung erhält man eine Lösung, die bei Anwesenheit von Acetonkörpern in einer gewissen, unten angegebenen Menge eine rosa-violette Farbe aufweist. Normales Blut und normale Milch geben im Gegensatz zu normalem Urin mit *Rothera* vollständig negativen Ausschlag. Schon eine Farbe in Rosa ist folglich mit diesem Material ein Ausdruck für eine abnorme „Aceton"konzentration. Der „Gesamtacetongehalt" in normalem Blute kann nach einer von mir[2]) früher ausgeführten Untersuchung im Durchschnitt auf 1,5 mg pro Liter geschätzt werden. Der normale Gehalt des Urins an genannten Stoffen ist, wie bereits hervorgehoben, nicht wesentlich größer als etwa 2 mg. Beim ersten Blick kann es nicht recht erklärlich scheinen, warum normaler Urin öfters positiven „*Rothera*" liefert, während normales Blut ausnahmslos negatives Resultat ergibt. Bei der Anwendung der Probe nach *Rothera* bei Blut erhält man eine besonders voluminöse Proteinfällung. Diese adsorbiert die vorhandenen Acetonstoffe in gewisser Ausdehnung. Dieses ist zweifellos die Hauptursache, daß nicht nur normales Blut, sondern auch solches, welchem bis zu etwa 10 mg Acetacetat (berechnet als Aceton) zugesetzt werden, keine positive Reaktion mit *Rotheras* Probe bei direkter Anwendung derselben ergeben. Die Empfindlichkeitsgrenze der Probe liegt nämlich bei etwa 10 mg Acetacetat (berechnet als Aceton) pro Liter Blut. Erinnern wir uns in diesem Zusammenhang des Verhaltens, daß die Acetessigsäure etwa 50 Proz. des Totalacetongehalts im Blute ausmacht, würde also selbst ein so leichter Fall von Acetonämie, bei dem der Gesamtacetongehalt bis zu etwa 20 mg pro Liter Blut geht, mit Hilfe von *Rotheras* einfacher Probe direkt nachweisbar sein.

---

[1]) In einer von *Allen* und *Wishart* (Amer. Journ. of medical. Sciences **161**, 165, 1921) publizierten Arbeit wird in einer Tabelle über phlorrhizinvergiftete Hunde berichtet, daß sowohl der Urin als auch das Blutserum mit Nitroprussidnatrium positiv reagierten. Irgendwelche Einzelheiten über Ausführung der Probe liegen jedoch nicht vor. Auch in anderen Arbeiten dieser Forscher habe ich irgendwelche diesbezügliche Angaben nicht finden können.

[2]) *Engfeldt*, Dissertation, l. c.

Die Ausführung der Blutprobe.

10 ccm Blut (Oxalatblut) werden mit 1 ccm konzentrierten Ammoniaks versetzt und umgeschüttelt. Die Blutkörpermembran geht hierbei in Lösung, und man erhält ein völlig homogenes Medium. Nach Zusatz von einigen Tropfen 5proz. Nitroprussidnatriums werden 1 bis 2 Teelöffel Ammoniumsulfat zugegeben, wonach man die Mischung wenigstens 5 Minuten kräftig umschüttelt. Für das Gelingen der Probe ist es von größter Wichtigkeit, daß die Lösung vollständig salzgesättigt wird, denn im anderen Falle kann ein Teil des Blutfarbstoffes in der Lösung verbleiben und bei der folgenden Filtrierung das Filter passieren, wodurch die Beurteilung unmöglich wird.

Kolorimetrisch approximative Bestimmung des Gesamtacetongehalts im Urin mit Hilfe der Probe nach Rothera und mit Permanganat als Standardlösung.

Kritische Vorbemerkungen.

1917 legten *Lenk* und *Hahn*[1]) eine auf einer Kombination zwischen *Legals* und *Riminis*[2]) Acetonprobe gegründete kolorimetrische Methode vor, Aceton und Acetessigsäure im Urin approximativ zu bestimmen. „*Rimini*" reagiert nach den Verfassern mit Aceton erst bei einer Konzentration von 0,6 Proz. Mit Acetessigsäure würde man bei einer wesentlich niedrigeren Konzentration positives Resultat erhalten. Da nun eine Konzentration von 0,6 Proz. Aceton im Urin nicht vorkommt, so würde *Riminis* Probe nur den Gehalt des Urins an Acetessigsäure angeben. Die *Legal*sche Probe reagiert dagegen sowohl mit Aceton als auch mit Acetessigsäure, obwohl die letztere ein 5,55mal stärkeres Reaktionsprodukt liefern würde. Die quantitative Bestimmung führen die Verfasser durch Verdünnung mit Wasser durch, bis das Reaktionsgemisch farblos wird. Mit Hilfe einer auf empirischem Wege ausgearbeiteten Tabelle wird darauf die Aceton- und Acetessigsäurekonzentration berechnet.

Die Methode enthält mehrere prinzipielle Fehler. Vor allem ist die Angabe, daß die Acetessigsäure mit *Legal* ein 5,55mal farbenstärkeres Reaktionsprodukt als mit Aceton ergibt, falsch. Die Acetessigsäure, als Aceton gerechnet, gibt eine etwa 20mal farbenstärkere Substanz. Weiter ist die Acetonkonzentration, die in Wirklichkeit vorhanden ist, auch bei schweren Fällen von Acidose so gering, daß ihr Beitrag zum Farbstoff als nichts oder sehr minimal betrachtet werden kann.

Die Empfindlichkeitsgrenze der *Legal*schen Probe liegt, soweit es sich auf das Aceton in rein wässeriger Lösung bezieht, bei 100 bis 200 mg per Liter. Beim Versuch mit normalem Urin, versetzt mit diesen Quantitäten, fällt die *Legal*sche Probe negativ aus, vermutlich wegen der Eigenfarbe des Urins. Man kann annehmen, daß dieselbe die an und für sich äußerst schwache Farbe, die gebildet wird, verwischt. Auch bei einer Konzentration von 500 mg pro Liter Urin wird das Resultat sehr undeutlich. Nehmen wir nun an, daß das Aceton etwa $^1/_{10}$ des Gesamtacetongehalts des Urins ausmacht, so würde im letztgenannten Falle, selbst wenn der Totalacetongehalt den unwahrscheinlich hohen Wert von etwa 5 g pro Liter erreichen

[1]) l. c.
[2]) l. c.

sollte, das vorhandene präformierte Aceton nur ganz unbedeutend zur Bildung des *Legal*schen Farbstoffs beitragen.

Eine Variante der kolorimetrischen Bestimmungsmethode nach *Lenk-Hahn* wurde 1919 von *Schall*[1]) vorgelegt. Da dieselbe in mehreren Punkten auf ebendenselben in der *Lenk-Hahn*schen Arbeit falschen Vorstellungen hinsichtlich der Art beruht, wie die Acetessigsäure bzw. das Aceton mit Nitroprussidnatrium quantitativ reagiert, halte ich es für überflüssig, näher auf dieselbe einzugehen.

Ungefähr gleichzeitig mit *Schall* legte auch *Adler*[2]) eine auf der *Legal*schen Probe gegründete kolorimetrische Methode für die Bestimmung des Totalacetongehalts im Urin vor. Als Vergleichslösung werden empirisch eingestellte Farblösungen von einer Farbenstärke vorgeschlagen, die 0,1 bis 0,005 Proz. Aceton entsprechen.

Vor einigen Jahren hatte ich Gelegenheit zur Prüfung dieser Methode. Aus vorher angegebenen Gründen wurde die Prüfung mit Hilfe der Acetessigsäure durchgeführt. Als Standardlösung wurden Originalfarblösungen angewandt, die man mir zur Verfügung stellte. Die Methode arbeitete nicht besonders korrekt.

Der bei Durchführung der *Legal*schen Probe erhaltene Farbstoff ist von sehr kurzer Dauer. Bei der Aufbewahrung fällt er einer schnell verlaufenden Veränderung sowohl betreffs der Farbenstärke als auch -nuance anheim. Deshalb scheint mir die *Legal*sche Probe an und für sich als Basis für eine kolorimetrische Bestimmungsmethode weniger geeignet zu sein. *Rotheras* Modifikation hat in dieser Hinsicht bedeutend größere Voraussetzungen. Teils ist der Farbstoff wesentlich intensiver, teils ist er haltbarer. Hierzu kommt die außerordentliche Empfindlichkeit der Probe.

Mit Rücksicht auf die in größerem Maße eingeführte Insulinbehandlung erscheint mir eine quantitative, schnell durchführbare Methode, die auf eine einigermaßen zufriedenstellende Weise die Schätzung des „Acetongehalts" auch bei einer schwach ausgeprägter Acidose zuläßt, besonders wünschenswert.

Bei der Bearbeitung der qualitativen Probe nach *Rothera* zur quantitativen, habe ich alle zeittötenden Operationen zu vermeiden versucht. Die Bestimmung läßt sich in der Regel in etwa 10 Minuten ohne eine besondere chemische Apparatur, nur mit einigen Proberöhren, Filtriertrichtern und Meßgefäßen ausführen. Auf Grund meiner vorher gemachten Angaben dürfte die Methode besonders dort anwendbar sein, wo dem Analytiker keine Laboratorienausrüstung zur Verfügung steht. Als Standardlösung habe ich eine Permanganatlösung von einer gewissen Stärke für geeignet gefunden.

Bevor ich zur Beschreibung der Methode übergehe, will ich als Beleg für die Anwendbarkeit des Permanganats als Vergleichsmaterial

[1]) *Schall*, Münch. med. Wochenschr. 66, 812, 1919.
[2]) *Adler*, ebendaselbst 66, 722, 1919.

das Resultat einer zusammen mit Prof. *A. V. Sahlstedt* ausgeführten Untersuchung des Absorptionsspektrums des Permanganats und des *Rothera*schen Farbstoffes vorlegen.

Spektrophotographische Untersuchung.

Als Resultat der genannten Untersuchung lege ich die beigefügten Bilder vor, die zeigen, daß zwischen den Absorptionsgebieten der mit *Rotheras* Probe und der mit einer Permanganatlösung erhaltenen Farben eine sehr nahe Übereinstimmung besteht. Die Verhältnisse sind für einen kolorimetrischen Vergleich, bei dem die Standardlösung andere Zusammensetzung als die untersuchte hat, somit besonders günstig.

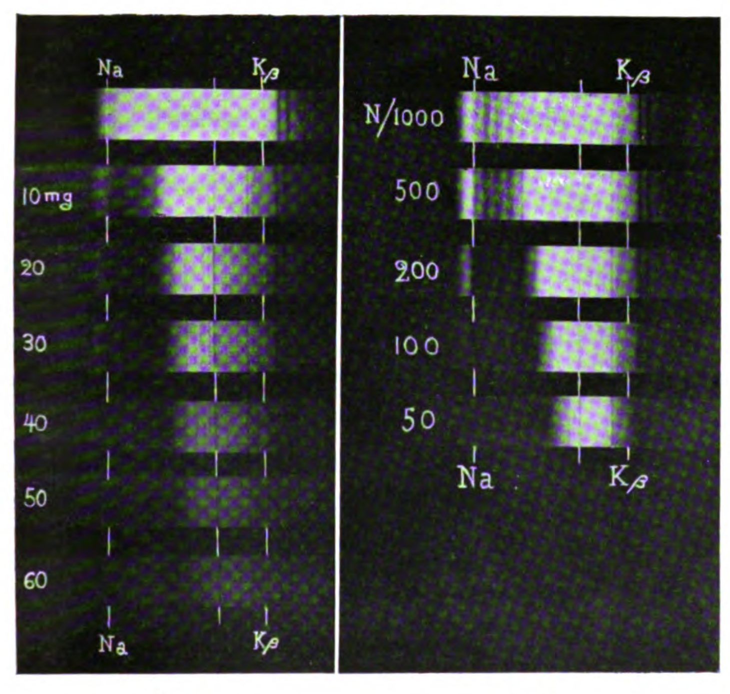


Abb. 1. Abb. 2.

Die Photographien sind mit Hilfe eines Taschenspektroskops angefertigt, das an einer Kamera mit anastigmatischem Objektiv befestigt ist. Die Platten — Perutz, panchromatische „Perchroma"-Platten — lagen in einer Multiplikatorkassette, weshalb die Bilder in unmittelbarer Folge aufeinander aufgenommen werden konnten. Als Lichtquelle diente der wolkenfreie Himmel (bei Mittagszeit), und die Exponierungszeit war genau dieselbe für alle Bilder in ebenderselben Serie, weshalb diese untereinander völlig vergleichbar sind.

In Abb. 1 finden wir oben ein reines Tageslichtspektrum, unten die Absorptionsspektra, die der *Rothera*sche Farbstoff in verschiedenen Konzentrationen gibt. Diese sind in der Figur in Milligrammen Acetessigsäure (als Aceton berechnet) per Liter angegeben. Die photographische Aufnahme wurde präzise 10 Minuten nach dem Ammoniakzusatz gemacht.

Abb. 2 bildet die Absorptionsspektra des Kaliumpermanganats in den Konzentrationen n/1000 bis n/50 ab. Zwecks Orientierung des Absorptionsgebietes sind in den Figuren die Na-Linie und die K_β-Linie angegeben.

Die Ausführung der kolorimetrischen Bestimmung.

In der Regel soll die Bestimmung mit verdünntem Urin ausgeführt werden. Nur in dem Falle, wenn der Totalacetongehalt weniger als 200 mg pro Liter beträgt, kann dieselbe mit unverdünntem Urin ausgeführt werden[1]). Im *letzteren Falle* und überhaupt, wenn der Urin stark gefärbt ist, muß derselbe mit Tierkohle entfärbt werden. Dieses geschieht auf folgende Weise: etwa 20 ccm Urin, eventuell verdünnt, werden einige Minuten mit einem gestrichenen Teelöffel (etwa $\frac{1}{4}$ g) hochwertiger Tierkohle (medizinale *Merck* oder gleichwertig) geschüttelt und filtriert. Mit 10 ccm Urinfiltrat oder 10 ccm bis fast zur Farblosigkeit verdünntem Urin wird die *Rothera*sche Probe folgendermaßen ausgeführt. Man setzt einen gehäuften Teelöffel (8 bis 10 g) Ammoniumsulfat zu, darauf 5 Tropfen 5proz. Nitroprussidnatrium[2]) und 1 ccm konzentriertes Ammoniak (etwa 25 Proz.). Die Mischung wird unablässig 5 Minuten lang unter der Beobachtung, daß das Salz stets im Überschuß vorhanden ist, umgeschüttelt und danach durch ein trockenes Filter filtriert. Nach 8 Minuten, von dem Augenblick der Zufuhr des Ammoniaks an gerechnet, werden 5 oder 10 ccm des erhaltenen Filtrats der kolorimetrischen Einstellung und Beurteilung unterzogen. Als Vergleichslösung wird n/100 $KMnO_4$ angewandt. Letztgenannte Lösung bereitet man im allgemeinen frisch durch Verdünnung einer n/10.

Bei der kolorimetrischen Einstellung können gewöhnliche Proberöhren angewandt werden[3]). Man achtet hierbei darauf, daß die beiden

[1]) Falls bei einem orientierenden Versuch eine mehr als zehnfache Verdünnung bei der kolorimetrischen Einstellung nötig ist, soll verdünnter Urin angewandt werden.

[2]) Zum Ausmessen der Nitroprussidnatriumlösung habe ich eine gegewöhnliche, sogenannte T.-K.-Tropfflasche von solcher Beschaffenheit angewandt, daß 25 Tropfen 2 g wogen. 5 Tropfen reichen bei einer Totalacetonkonzentration von 500 mg pro Liter aus. Beim Versuch mit schwach acetonhaltigem oder verdünntem Urin muß man darauf achten, daß die angegebene Menge Nitroprussidnatrium nicht überschritten wird, da dessen Vorhandensein in größerer Menge durch seine Eigenfarbe störend wirkt.

[3]) Bei einem Vortrag im Januar 1925 vor dem Verein für innere Medizin in Stockholm demonstrierte der Verfasser ein für die Anwendung obiger Methode bestimmtes einfaches Verdünnungsgefäß nebst einem Behälter zum Zwecke der Aufbewahrung der Vergleichslösung. Beide Gefäße waren aus ebenderselben Glassorte hergestellt und hatten einen Durchmesser von etwa 15 mm. Das für die Vergleichslösung dienende Gefäß war ungradiert und etwa 20 cm lang, das zur Verdünnung benutzte, etwa 100 ccm fassende, war mit einer unten beginnenden Gradierung von je 5 ccm versehen. (*Grave*-Stockholm hält derartige Röhren auf Vorrat.) Selbstverständlich kann derjenige, welchem ein Kolorimeter zur Verfügung steht, ebenfalls die Einstellung mit den genannten Instrumenten vorteilhaft durchführen.

Proberöhren ebendenselben Durchmesser besitzen und von farblosem Glas sind. Sollte das Filtrat farbenstärker als die Vergleichslösung sein, so wird dasselbe *sofort* mit Wasser so lange verdünnt, bis die Farbenstärke beider Proben *beinahe* übereinstimmen. Eine *vollständige* Übereinstimmung zwischen den Farben der Probe und der Vergleichslösung liegt nicht vor. Die Farbe der Probe erscheint eine Spur blauer. Die Einstellung soll bei künstlicher Beleuchtung vorgenommen werden. Eine zweckdienliche Anordnung besteht darin, daß zwischen die Lichtquelle und unmittelbar hinter die Proberöhren weißes Papier gebracht wird — nicht völlig weißes; einfaches, sogenanntes Konzeptpapier ist beinahe vorteilhafter als ganz weißes —. Bei der genannten Anordnung faßt man die Farbe selbst mehr als rot auf, aber die *Farbenstärke* läßt sich leichter beurteilen. Etwa 25 mg Totalaceton pro Liter ergeben unter den angegebenen Bedingungen einen „*Rothera*“ von einer Farbenstärke, die mit derjenigen der vorgeschlagenen Vergleichslösung zusammenfällt. Der Gesamtacetongehalt des Urins geht direkt aus dem Verdünnungsgrad hervor. Die Einstellung auf die Vergleichslösung soll innerhalb 10 bis 11 Minuten abgeschlossen sein, von dem Augenblick des Ammoniakzusatzes an gerechnet, und zwar mit Rücksicht auf die begrenzte Haltbarkeit des gebildeten Farbstoffes.

In der vorher mitgeteilten Vorschrift verdienen zweifellos zwei Einzelheiten eine eingehendere Diskussion, nämlich die Tierkohlebehandlung und das Prinzip, nach dem der für die Berechnung der Werte angegebene Faktor 25 ermittelt wurde.

Falls es sich um einen stark „aceton“haltigen oder fast farblosen Urin handelt, kann die Tierkohlebehandlung als unnötig betrachtet werden. Dagegen hat sich dieselbe, wie bereits hervorgehoben, als notwendig erwiesen bei niedrigeren „Aceton“konzentrationen, vor allem bei stark gefärbten Urinen. Die Eigenfarbe des Urins macht sich nämlich unvorteilhaft geltend. Man erhält bei Ausführung der Probe eine etwas mehr rötliche Farbe, die in einem gewissen Grade von der violetten der Vergleichslösung abweicht und die Beurteilung nicht unbedeutend erschwert oder sogar unmöglich macht. Wird der Urin vor Ausführung der Probe mit Tierkohle entfärbt, so beseitigt man den genannten Nachteil. Wie sich andererseits denken läßt, kann sich die Oberflächenaktivität zwischen Tierkohle und den anwesenden Acetonkörpern in einem solchen Grade geltend machen, daß das Resultat besonders bei niedrigeren Konzentrationen vom quantitativen Gesichtspunkt gefährdet wird. Aus folgenden Versuchen geht jedoch hervor, daß die Adsorption im vorliegenden Falle praktisch keine Rolle spielt.

1. Versuch mit normalem Urin.

Normaler Urin, der bei direkter Prüfung schwach positiven „*Rothera*“ von „gewöhnlicher“ Stärke ergab, wurde mit Tierkohle behandelt und filtriert. Das Filtrat gab ebenfalls positiven „*Rothera*“. Ich bekam eine zwar schwache, aber deutliche rosa Farbe. Die bei direktem Versuch mit Urin erhaltene Farbe war wegen der Eigenfarbe des Urins weniger definierbar, wenn sie auch als positiv für die Probe angesehen werden mußte.

Die Versuche legen klar, daß das Adsorptionsvermögen zwischen Tierkohle und Totalaceton als ziemlich unbedeutend anzunehmen ist. Der Gesamtacetongehalt in normalem Urin kann nämlich, wie bereits hervorgehoben, im Durchschnitt auf 2 mg pro Liter geschätzt werden. Wir bemerken also, daß der Totalacetongehalt bei dem fraglichen, 20 ccm Urin umfassenden Versuch auf 0,04 mg berechnet werden kann. Auch wenn wir mit Rücksicht auf die vorher besprochenen Variationen in dem physiologischen Totalacetongehalt die Ziffer verdoppeln, so besagt der Versuch doch, daß ¼ g Tierkohle, welches für die Entfärbung des Urins völlig ausreichend war, weniger als 0,08 mg Totalaceton adsorbiert hatte.

2. Versuch mit normalem Urin, versetzt mit Acetacetat.

10 ccm acetonfreies Na-Acetacetat wurden mit 90 ccm normalem Urin verdünnt. 10 ccm wurden mit Essigsäure angesäuert, mit 50 ccm Wasser verdünnt und bei konstantem Niveau destilliert[1]). Das Destillat verbrauchte 4,9 ccm n/10 Jod. 20 ccm des genannten acetacetathaltigen Urins wurden mit einem gestrichenen Teelöffel Tierkohle geschüttelt und filtriert. 10 ccm des erhaltenen Filtrats verbrauchten nach der Destillation 4,85 ccm n/10 Jod.

Die Differenz zwischen den beiden Versuchen geht nur bis zu 0,05 ccm n/10 Jod, 1 Proz. des ursprünglichen Wertes entsprechend. Ich wage daher die Auffassung zu vertreten, daß das Acetacetat entweder gar nicht oder nur in ganz unbedeutendem Grade von der Tierkohle adsorptiv beeinflußt wird.

3. Versuch mit pathologischem Urin.

10 ccm Diabetikerurin, dreimal 24 Stunden aufbewahrt (einschließlich Aufsammlungstag) wurden der Destillation nach obiger Beschreibung unterzogen. Das Destillat verbrauchte 1,9 ccm n/10 Jod. Beim „Blasen nach *Folin* (Journ. of biol. Chem. **3**, 177, 1907) erhielt ich einen Jodverbrauch von 0 : 4 n/10 Jod. Das präformierte Aceton betrug also in diesem dreimal 24 Stunden aufbewahrten Urin 22 Proz. des Totalacetongehalts. Nach der Tierkohlebehandlung verbrauchte das Destillat von 10 ccm Filtrat 1,7 ccm n/10 Jod. Der Verlust nach der Tierkohlebehandlung erreicht somit etwa 10 Proz. Auch wenn dieser Verlust an und für sich als unbedeutend angesehen werden kann, so muß man doch zugeben, daß sich die Adsorption in diesem Falle auf deutlichere Weise zu erkennen gibt als bei dem soeben angeführten Versuch mit dem mit Na-Acetacetat versetzten Urin, wobei der Verlust gleich Null oder ganz unbedeutend war. Im vorliegenden Falle haben wir jedoch mit einem weiteren Faktor zu

---

[1]) Hierbei wurde ebenso wie bei den übrigen Destillationen der von mir für die Mikrobestimmung der Acetonkörper vorgeschlagene Destillationsapparat angewendet (diese Zeitschr. **144**, 556, 1924).

rechnen, nämlich der Adsorption, welcher das vorhandene, präformierte Aceton bei der Tierkohlebehandlung anheimfällt. Das angewandte Material enthielt pro Liter etwa 40 mg Aceton und etwa 150 mg Acetacetat, berechnet als Aceton. In der Tat wird das Aceton in wässeriger Lösung wenigstens in gewissen niedrigeren Konzentrationen von der Tierkohle in nicht allzu unbedeutendem Grade beeinflußt. Als Beleg hierfür werde ich aus einer bei einer vorhergehenden Gelegenheit gemachten Versuchsserie folgenden Fall anführen. 100 ccm einer wässerigen Lösung, die 9,8 mg Aceton enthielt, wurden einige Minuten mit 0,2 g Tierkohle geschüttelt und filtriert. Im Filtrat fand ich nur 6,6 mg Aceton wieder. Der Verlust durch Adsorption ging also bis zu 32,6 Proz.

Man kann folglich annehmen, daß der Verlust an etwa 10 Proz. Totalaceton, der bei der Tierkohlebehandlung des pathologischen Urins konstatiert wurde, hauptsächlich durch die Adsorption verursacht wurde, welche zwischen der Kohle und dem vorhandenen präformierten Aceton zustande kam.

Das Acetacetat findet man dagegen, praktisch genommen, nach der Tierkohlebehandlung in unverminderter Menge wieder.

Wie bereits hervorgehoben, erreicht selbst bei schweren Fällen von Acidose der Gehalt des Urins an präformiertem Aceton kaum solche Mengen, daß er entweder bei Ausführung der *Legal*schen oder der *Rothera*schen Probe zum Auftreten der Farbstoffe beitragen dürfte. Im großen ganzen ist es ausschließlich das vorhandene Acetacetat, das mit Nitroprussidnatrium die Entstehung der gefärbten Reaktionsprodukte verursacht. Unter solchen Verhältnissen fehlt dem oben angewiesenen Acetonverlust bei der Behandlung des Urins mit Tierkohle jede quantitative Bedeutung bei Anwendung der kolorimetrischen Methode.

Schließlich werde ich in Kürze das Prinzip erläutern, nach dem der für die Berechnung des Totalacetongehalts angebene Faktor 25 ermittelt wurde.

Eine wässerige Lösung von Na-Acetacetat gibt, als Aceton berechnet, schon bei einer Konzentration von etwa 22 mg pro Liter eine Farbe, die mit derjenigen einer n/100 $KMnO_4$-Lösung fast übereinstimmt. Legt man bei der Untersuchung von pathologischem Urin den Faktor 22 der Berechnung des sogenannten Totalacetongehalts zugrunde, so erhält man in der Regel zu niedrige Werte. Aus den vorigen Ausführungen geht jedoch hervor, daß einesteils im großen ganzen es nur das Acetacetat ist, welches mit *Rothera* reagiert, daß anderenteils das Acetacetat, als Aceton berechnet, 85 bis 90 Proz. des sogenannten Totalacetongehalts des Urins ausmacht. Da wir nun diesen zu bestimmen wünschen, glaubte ich den Faktor auf 25 erhöhen zu müssen.

Die Prüfung der Methode an klinischem Material.

(Urin vom Serafimerlazarett in Stockholm.)

Die von mir untersuchten Urine bestanden aus Proben der Tagesmengen. Die Urinproben wurden morgens abgeholt und im Laufe desselben Tages analysiert. Die Analysen erstreckten sich teils auf jodo-

metrische Bestimmung des Acetongehalts nach der Destillationsmethode, teils auf die Bestimmung des Gehalts an präformiertem Aceton nach der von *Folin* angegebenen „Blas"methode, diese ebenfalls, wie bekannt, auf jodometrischem Wege. Ferner wurde die oben angegebene kolorimetrische Methode angewandt und der Verdünnungsgrad für die Einstellung auf die Vergleichslösung festgestellt.

Tabelle IV.

Probe	Präformiertes Aceton. Blasen mg pro Liter	Gesamtaceton. Destillation mg pro Liter	Bei kolorimetrischer Messung gefundener Verdünnungsgrad	Gesamtaceton, aus Verdünnungsgrad berechnet mg pro Liter	Fehlerprozent, auf die Destillationswerte berechnet Proz.	Anmerkung betreffs der Ausführung der kolorimetrischen Bestimmung
E.	20	295	11 ×	275	— 6,7	Keine Kohle, ohne Verdünnung
S.	13,5	213	9 ×	225	+ 5,6	Keine Kohle, ohne Verdünnung
J.	168	1393	60 ×	1500	+ 7,7	Keine Kohle, zehnfache Verdünnung
G.	15,5	164	7 ×	175	+ 6,7	Kohle, ohne Verdünnung
J.	304,6	1547	60 ×	1500	— 3	Keine Kohle, zehnfache Verdünnung
P.	140	1044	40 ×	1000	— 4,2	Keine Kohle, zehnfache Verdünnung
E.	7,7	104	4,5×	113	+ 8,2	Keine Kohle, ohne Verdünnung
G.	13,5	143	6 ×	150	+ 4,9	Kohle, ohne Verdünnung

Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht unter anderem folgendes hervor:

1. *Legals* Nitroprussidnatriumprobe gibt bezüglich der Acetessigsäure (als Aceton berechnet) ein etwa 20 mal farbenstärkeres Reaktionsprodukt als hinsichtlich des Acetons.

2. Die Empfindlichkeitsgrenze bei der *Legal*schen Probe liegt bezüglich der Acetessigsäure (als Aceton berechnet) bei der Konzentration von 6 mg/1000 ccm; bezüglich des Acetons bei der Konzentration 100 mg/1000 ccm.

3. *Rotheras* Probe gibt mit Acetessigsäure ein etwa 70 mal farbenstärkeres Reaktionsprodukt als mit Aceton, doch unter der Voraussetzung, daß bei der vergleichenden Untersuchung die Beobachtungszeit auf 10 Minuten eingeschränkt wird.

4. Die Empfindlichkeitsgrenze für die letztgenannte Probe liegt bezüglich der Acetessigsäure bei der Konzentration von etwa 1 mg/1000 ccm, bezüglich des Acetons bei einer Konzentration von 100 mg/1000 ccm, doch alles unter der Voraussetzung, daß obengenannte Begrenzung der Beobachtungszeit eingehalten wird.

5. Der mit *Rotheras* Probe von der Acetessigsäure erhaltene violette Farbstoff wird allmählich gebildet und erreicht, wenigstens bei den

Konzentrationen, die unter pathologischen Verhältnissen vorkommen, bereits nach etwa 10 Minuten seine maximale Stärke, um dann nach Ablauf von 1/2 bis 1 Stunde langsam in einen gelben, schwach ins Grüne gehenden Farbstoff überzugehen.

6. Die vorhergenannte Probe mit Aceton bildet ebenfalls violetten Farbstoff, der wesentlich langsamer zur Erscheinung kommt. Erst nach 1/2 bis 1 Stunde erreicht derselbe bei Zimmertemperatur seine größte Farbenstärke, um nach etwa 3 Stunden allmählich scheinbar in denselben gelbgrünen Farbstoff überzugehen, der aus der Acetessigsäure erhalten wurde.

7. Sowohl *Legals* wie *Rotheras* Probe sollen direkt im Urin ausgeführt werden, nicht in seinem Destillat.

8. *Rotheras* Probe ist wegen ihrer größeren Empfindlichkeit und der größeren Haltbarkeit des erhaltenen Farbstoffes vom qualitativen wie quantitativen Gesichtspunkt durchaus der Vorzug vor der *Legal*schen Probe zu geben.

9. *Rotheras* Probe ist wegen ihrer außerordentlichen Empfindlichkeit innerhalb gewisser, von mir angegebener Grenzen für den direkten Nachweis eines abnormen „Aceton"gehalts im Blute anwendbar. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei etwa 10 mg Acetacetat (als Aceton berechnet) pro Liter oder bei etwa 20 mg „Totalaceton". Letztgenannte Ziffern werden unter Hinweis auf das Verhalten angeführt, daß im zirkulierenden Blute Aceton und Acetacetat in ebenderselben Konzentration auftreten.

10. Schließlich hat sich eine auf *Rotheras* Probe gegründete, approximative Methode für die kolorimetrische Bestimmung des Gesamtacetongehalts im Urin als für die Praxis anwendbar erwiesen, vor allem in solchen Fällen, wo dem Analytiker eine Laboratoriumsausrüstung nicht zur Verfügung steht.

Über die Bestimmung von kleinen Arsenmengen in Tierorganen.

Von

Emil Přibyl.

(Aus dem chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule in Brünn, Tschechoslowakei.)

(Eingegangen am 6. April 1925.)

Als zuverlässigste Methode zur qualitativen Arsenbestimmung wird diejenige von *Marsh* angewandt. Bei dieser Prüfung müssen die organischen Substanzen oxydiert werden, eine Operation, die eine beträchtliche Menge verschiedener Chemikalien (Schwefelsäure, Chlorwasserstoffsäure, eventuell Salpetersäure, Zink, Kaliumchlorat, Schwefelwasserstoff usw.) verlangt, die absolut chemisch rein sein müssen. Überdies ist die eigentliche Vorbereitung zur Wasserstoffreduktion sehr zeitraubend. Aus allen diesen Gründen ist die ganze Methode kostspielig und unzweckmäßig für solche Fälle, in denen der Arsengehalt billig und schnell nachgewiesen werden soll, sowie auch, wenn es sich um öfteren Arsennachweis handelt. Dies gab mir Veranlassung zu einem Versuch, die *Marsh*sche Methode durch eine andere, gleichfalls zuverlässige Prüfung zu ersetzen.

In erster Reihe untersuchte ich die *Reinsche* Methode.

Bei dieser benutzt man die Eigenschaft des Arsens, daß es sich in salzsaurer Lösung bei einer Temperatur von etwa 90° auf einem blanken Kupferblech ausscheidet. Die organischen Substanzen brauchen dabei nicht zerstört zu werden, es wird nur in Chlorwasserstoffsäure gekocht, die leicht chemisch rein (arsenfrei) vorbereitet werden kann und auch billig ist. Die ganze Prüfung dauert etwa 20 Minuten; man kann auch noch sehr geringe Arsenspuren als einen braunen bis schwarzen Beschlag auf dem blanken Kupferblech deutlich nachweisen.

Zunächst habe ich in meiner Arbeit die Genauigkeit dieser Methode geprüft und festgestellt, daß sie vorzüglich ist ($^1/_{500}$ mg As).

Weiter habe ich ermittelt, eine wie große Blechfläche zur quantitativen Ausscheidung des Arsens erforderlich ist und welches die Bedingungen der Ausscheidung sind.

Drittens habe ich die Überführung des Arsens vom Kupfer in die Lösung mit Hilfe neuer Lösungsmittel ausgeführt: statt mit rauchender Salpetersäure oder Bromwasser, mittels Jodlösung, ferner einer alkalischen Jodidlösung und Ätzalkalien.

Die vorgeschlagene Arbeitsweise gestattet die wiederholte Benutzung der Kupferbleche. In der Lösung läßt sich das As im Marshapparat bequem nachweisen. Eine direkte Bestimmung des auf dem Kupfer ausgeschiedenen As ist mir nicht gelungen; ich schlage hierfür eine Skala vor, die aus bestimmten ausgeschiedenen As-Mengen auf einer Reihe Kupferblättchen bereitet werden kann.

Die Vorbereitung.

Ich habe mir eine Reihe von Standardlösungen von Acid. arsenic. (absolut chemisch rein von *Kahlbaum*) in folgenden Konzentrationen vorbereitet: $^1/_{1000}$, $^1/_{5000}$, $^1/_{10\,000}$, $^1/_{50\,000}$, $^1/_{100\,000}$, $^1/_{500\,000}$, $^1/_{1\,000\,000}$. Eine genau abgemessene Menge wurde zuerst in warmer Natronlauge gelöst; darauf wurde bis zum entsprechenden Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt, wodurch eine klare Lösung erreicht wurde. Die Chlorwasserstoffsäure wurde zunächst mit Schwefelwasserstoff vom Arsen befreit und in einer Konzentration von 5 Proz. angewandt. Die Kupferblättchen wurden genau gleich aus einer chemisch reinen, elektrolytischen Kupferfolie ausgeschnitten und vor der Benutzung mit feinem Schmirgelpapier und Alkohol gereinigt. Immer wurde 1 ccm der Arseniklösung von entsprechender Konzentration genommen und 0,5 ccm 5proz. HCl zugefügt; in diese Lösung wurde ein gereinigtes Kupferblech hineingegeben und alles in einer Porzellanschale im Wasserbade erwärmt.

Experimenteller Teil.

Schon nach 5 Minuten langem Kochen läßt sich der Beginn der schwarzbraunen Abscheidung auf dem Kupferblech beobachten; nicht vollkommen ausgeputzte Bleche überziehen sich fleckenweise, die reinen jedoch ganz gleichmäßig. Die Schnelligkeit des Ausscheidens hängt auch von der Acidität der As-Lösung ab. Optimal bilden sich die Beschläge, wenn man zu 1 ccm Standardlösung 0,5 ccm 5proz. HCl zugefügt hat. Nach der Intensität des Beschlages und nach der Größe der gefärbten Fläche kann man die Arsenmenge beiläufig abschätzen. Zur Ausscheidung von 1 mg As_2O_3 ist eine Oberfläche von 18,75 qcm nötig. Für $^1/_5$ mg braucht man 14 qcm Fläche, für $^1/_{10}$ mg ebenfalls so viel, für $^1/_{50}$ mg nur 7,5 qcm, für $^1/_{100}$ mg etwas weniger, für $^1/_{500}$ mg nur ein kleines Blech von 3,75 qcm Oberfläche. Der Beschlag ist ganz schwach, aber noch sichtbar; $^1/_{1000}$ mg läßt sich mit der *Rein*schen Methode nicht mehr nachweisen. Die Kupferstreifen wurden nacheinander in die Lösung gelegt und nach dem Herausnehmen mit destilliertem Wasser abgespült. Die Intensität des Beschlages ist auf dem ersten Kupferstreifen am stärksten, auf den anderen nimmt sie nach und nach ab.

Die Lösungen wurden immer 10 Minuten bei 90° erwärmt. Als Kontrolle legte ich ein kleines Blech in 1 ccm destillierten Wassers unter Zusatz von 0,5 ccm 5proz. HCl ein und erwärmte es auch 10 Minuten wie bei den Hauptversuchen.

Titrationsversuche.

Es handelte sich um die Möglichkeit, aus dem Beschlage genau die Arsenmenge zu bestimmen. Der Gedanke war folgender: Den Beschlag in irgend einem Mittel aufzulösen und dann titrimetrisch die Arsenmenge zu bestimmen. In den ersten Versuchen wurde zur Auflösung des Beschlages rauchende Salpetersäure angewandt, es erwies sich jedoch, daß sie auch das Kupfer selbst auflöst; für diesen Zweck war sie also unbrauchbar. Alsdann wurde die titrierte *Lugol*sche Lösung benutzt. Auch in diesem Falle zersetzte sich das Kupfer, so daß die As-Titration nicht möglich war. Es geht das aus den Zahlen der Tabelle hervor. welche die Menge der als Titrationsfaktor verwendeten Natriumthiosulfatlösung angeben.

Das Kupferblech hineingegeben in 1 ccm			Der Verbrauch des Natriumthiosulfats ccm
$^1/_{1000}$	As L. + $^1/_2$ ccm HCl	Nach 10 Min. Erwärmen bei etwa 90° wurde das Kupferblech herausgenommen, mit dest. Wasser abgespült, der Beschlag in 1 ccm n/10 KJ aufgelöst und die Lösung mit n/10 Natriumthiosulfat titriert	0,15
$^1/_{5000}$			0,25
$^1/_{10\,000}$			0,50
$^1/_{50\,000}$			0,35
$^1/_{100\,000}$			0,35
$^1/_{500\,000}$			0,30
$^1/_{1\,000\,000}$			0,35
dest. Wasser + $^1/_2$ ccm HCl			0,40

Weiter verwandte ich zur Auflösung des Beschlages Kali- und Natronlauge in Konzentrationen von 10, 20 und 30 Proz. Nach 2 Minuten langem Abwaschen mit der warmen Lauge verschwand der Beschlag gänzlich: darauf säuerte ich die Lauge an, gab 1 ccm n/10 Jodlösung hinzu und führte die Titration mit n/10 Natriumthiosulfatlösung aus, die aus einer automatischen Mikrobürette zutröpfelte. Als Indikator diente lösliche Stärke. Dieser Versuch ergab folgendes Resultat:

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Arsenmenge mit keiner dieser Methoden zu bestimmen ist, da bei der Auflösung des Beschlages auch das Kupfer angegriffen wird.

Ich stellte daher noch eine weitere Probe an. Die *Lugol*sche Lösung oder die Lauge mit Arsen wurde in den Marshapparat gegeben, um einen Arsenspiegel zu erzielen. Verwandte man zum Abwaschen des Beschlages die *Lugol*sche Lösung, so war der Arsenspiegel viel deutlicher als bei der Lauge, wenn auch in beiden Fällen dieselben Chemikalien angewandt und die gleiche Zeit innegehalten wurden. Den Spiegel erhielt ich jedoch nur, wenn der Beschlag aus einer Lösung mit mindestens 1 mg As stammte. Prüfte ich aber im Marshapparat den Beschlag aus einer Lösung mit weniger als 1 mg, so erschien der Spiegel nicht einmal in den kleinsten Spuren. wenn auch die Beschläge deutlich waren. Man sieht daher, daß die Prüfung nach der *Rein*schen Methode viel schärfer ist als die nach *Marsh*, da $^1/_{500}$ mg auf dem Kupfer noch einen klar sichtbaren Beschlag gibt, nach *Marsh* hingegen überhaupt nicht mehr nachweisbar ist.

Schließlich versuchte ich noch, As aus den Beschlägen durch eine vorläufige Reduktionsprobe zu bestimmen. Ein kleines Blech, zu einer Rolle gedreht, ließ ich in der beschriebenen Weise mit einem As-Beschlag überziehen, und nach dem Abspülen und Abtrocknen legte ich es in einen Glaskolben hinein; darauf fügte ich ein Stückchen Spodium zu und führte

die bekannte Reduktionsprobe auf As auf trockenem Wege aus. Obwohl ich etwa 20 Versuche mit Blechen verschiedener Intensität des As-Beschlages vornahm, erzielte ich überhaupt keinen Spiegel, auch wenn ich in den Kolben ein Körnchen kalzinierte Soda brachte.

Eine quantitative As-Bestimmung ist daher nur nach einer Skala der Beschläge, die aus As-Standardlösungen hergestellt sind, möglich; es ist nur nötig, die Versuchsbedingungen genau einzuhalten (Menge, Zeit, Chemikalien usw.).

Die Versuche sind noch nicht beendet; ich suche noch nach einer Methode, mit der man die Arsenmenge quantitativ aus den Beschlägen feststellen kann.

Die *Rein*sche Methode in meiner Modifikation wendet mit sehr gutem Erfolge Tomášek in seiner Arbeit an: Wie lange scheidet sich das Arsen in den Fäkalien und dem Urin der Pferde aus, denen As als Plastikum gegeben wird? Seine bisherigen Erfolge bestätigen die Empfindlichkeit, Einfachheit und Zweckmäßigkeit dieser Methode gegenüber der *Marsh*schen.

Zusammenfassung.

1. Die kostspielige *Marsh*sche Prüfung kann bei der As-Analyse durch die *Rein*sche Methode ersetzt werden.

2. Wenn man sich eine Skala der As-Beschläge auf dem Kupferblech herstellt, kann die Arsenmenge nach der Intensität des Beschlages bestimmt werden.

3. Zur Ausscheidung von 1 mg As braucht man 20 qcm Kupferblech in 4 qcm langen Streifen, die nach 5 Minuten in die zu prüfende Lösung gegeben werden.

4. Das ausgeschiedene As löst sich leicht in n/10 Jodlösung; diese durch Natriumthiosulfat entfärbte, As_2O_5 enthaltende Lösung kann man direkt im *Marsh*schen Apparat benutzen.

Literatur.

Wilhelm Autenrieth, Chemische und physikalische Untersuchungsmethoden der Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. IV, Teil 7, Heft 1. — *Rudolf Kobert*, Lehrbuch der Intoxikationen **2**. — *Hugo Engleson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**.

Studium der Eiweißkörperkoagulation in Tropfen.

VII. Mitteilung:

Studium der Präzipitinserumreaktionen mittels der Tropfenmethode.

Von

V. Moraško.

(Aus dem chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule in Brünn, Tschechoslowakei.)

(Eingegangen am 6. April 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die erste Aufgabe dieser Arbeit war, sicherzustellen, ob die Anwendung der *Bečka*schen Tropfenmethode zum Studium der Reaktionen der Präzipitinseren überhaupt möglich ist. Beim Studium der Koagulation durch chemische Fällungsmittel mit Hilfe der Tropfenmethode ist es gelungen, nachzuweisen, daß jedem Fällungsmittel ein Abbildungstypus entspricht, so daß man auf diese Weise die Fällungsmittel unterscheiden kann. Weiter wurde festgestellt, daß ähnliche, aber nicht so markante Unterschiede bei Eiweißen verschiedener Tiergattungen vorhanden sind.

Da die Präzipitinserumreaktionen Fällungsreaktionen sind, ist man zu der Annahme berechtigt, es könnte die Auffindung chemisch definierbarer Fällungsmittel gelingen, die unter gewissen Umständen Eiweißkörper nur einer bestimmten Art, wie etwa die spezifischen Präzipitinseren, fällen werden. Bei diesen Versuchen mußte man sich mit zufällig ausgewählten Fällungsmitteln begnügen, denn bis jetzt war die Aufstellung einer als sicher geltenden Hypothese noch unmöglich. Die vorliegenden Versuche sollen eine derartige Hypothese, vom serologischen Standpunkt aus, begründen helfen.

Wir gingen von folgender Idee aus: gelingt die Fällung mittels der Tropfenmethode, so wird man den Fällungstypus der Präzipitinserumreaktionen feststellen können. Wird nun ein Typus immer nur für eine bestimmte Antigenart erhalten, dann kann man voraussetzen, daß dieses Antigen am besten mit den Fällungsmitteln dieses Typus bestimmt werden wird. Was die serologische Seite anbelangt, so wird

man dann den Chemismus der Präzipitinreaktionen bestimmen können, denn aus dem Bilde wird klar ersichtlich sein, ob die Reaktion als eine Ionen-, Molekular- oder Kolloidalfällung verläuft.

Nach einem Vorversuche erwies es sich, daß die *Bečka*sche Tropfenmethode hier unter gewissen Umständen anzuwenden ist, und daß wirklich die im Kaninchen gegen ein spezifisches Antigen ausgebildeten Präzipitine in bestimmten, untereinander verschiedenen Typen fällen. Die ganze Arbeit konnte nicht in genügend großem Umfang durchgeführt werden, weil bei der Immunisierung eine Anzahl von Tieren unter anaphylaktischen Symptomen zugrunde ging.

Experimenteller Teil.

Für den ersten Versuch verwandte ich ein Präzipitinserum, das nach dreimaliger Pferdeseruminjektion von einem Kaninchen gewonnen worden war. Die Titration wurde nach *Uhlenhut* ausgeführt, der Titer betrug $^1/_{6000}$. Dieses Serum wurde mit physiologischer Lösung verdünnt und nach der *Bečka*schen Tropfenmethode auf eine Glasplatte getröpfelt. Die Fällung wurde mit gleichfalls verdünntem Pferdeserum ausgeführt. Schon nach einigen Minuten traten Niederschläge auf, ähnlich denjenigen, welche bei Anwendung stark verdünnter chemischer Fällungsmittel entstanden waren. Die Intensität nahm mit der Zeit zu. Um die Trübungen noch nach einer längeren Zeit beobachten zu können, wurde die Platte in einen Thermostaten mit feuchter Luft gelegt; nach 20 Minuten wurde das Ergebnis zum erstenmal, nach 60 Minuten zum zweitenmal und nach 5 Stunden zum drittenmal aufgezeichnet.

In den ersten senkrechten Reihen sollte die Verdünnungsstufe mit dem Titer nach *Uhlenhut* übereinstimmen, jedoch ist sie auf der Abb. 1 ungefähr 100mal kleiner, auf den Abb. 2 und 3 etwa einhalbmal kleiner. Dieser Umstand kann damit erklärt werden, daß bei der Titration nach *Uhlenhut* der Niederschlag in der ganzen Breite der Eprouvette beobachtet wird, während man in einem Tropfen nur eine geringe Dicke wahrnimmt. Die Trübungen sind jedoch genügend deutlich, wenn sie mit gutem Auge bei starker Beleuchtung (mit direktem Sonnenlicht) von der Seite beobachtet werden. Um die Ergebnisse richtig vergleichen zu können, muß man die Trübungen immer bei gleicher Beleuchtung und nach derselben Zeit ablesen. Unter diesen Umständen kann die *Bečka*sche Tropfenmethode zum Studium der Fällung angewandt werden.

Darauf wurden mehrere Kaninchen gegen die Eiweißkörper des Pferdes, des Menschen, der Kuh, der Ziege, des Schafes, des Hundes und der Henne immunisiert. Die Einzelheiten sind aus dem Protokoll ersichtlich. Obwohl ich der Anaphylaxie soweit als möglich vorbeugte, verlor ich doch einige Tiere. Von den Methoden, die wenigstens die Gefahr der Anaphylaxie herabsetzten, empfehle ich vor allem die Verminderung des injizierten Antigens, seine Verdünnung durch physiologische Lösung und schließlich, die Kaninchen nach der Reimmunisierung längere Zeit in der Kälte zu halten. Aber absolut sicher wird die Anaphylaxie durch keine dieser Operationen verhindert. Die eigentlichen Versuche mit den erzeugten Präzipitinseren wurden in drei Abteilungen eingeteilt:

1. Untersucht wird der Einfluß der Spezifität des Präzipitinserums auf ein bestimmtes Antigen. Die Versuche wurden mit Präzipitinseren durchgeführt und sämtliche Typen der Gattungspräzipitine aufgezeichnet (I. Teil der Diagramme).

2. Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Ausbildung der gefällten Fläche bei sämtlichen Präzipitinen (II. Teil der Diagramme).

3. Untersuchung des Einflusses der Reimmunisation auf den Typus der flokulierten Zonen. Hier wurde ein Versuch mit einem Präzipitin gegen menschliche Eiweißkörper durchgeführt (III. Teil der Diagramme).

I. Abteilung.

Die Versuche dieser Reihe sind im I. Teil der Diagramme angeführt.

Verfolgt man den Typus der betreffenden Seren, so bemerkt man in der ersten abgelesenen Zeit beim Präzipitin gegen Pferdeeiweißkörper die Verminderung der Koagulationsfähigkeit in beiden Richtungen, d. h. in der Richtung der Präzipitinverdünnung (wagerecht), sowie in der Richtung der Antigenverdünnung (senkrecht). Es entsteht ein ähnliches Bild wie bei dem Fällungstypus $H^{\cdot}$ (mit Säuren).

Das Präzipitin gegen Kuheiweiß fällt in oblonger Form stark verlängert in der Richtung des Eiweißes, so wie Ferrosulfat die Mehrzahl der Eiweißkörper fällte.

Das Präzipitin gegen Ziegeneiweiß zeichnet sich durch eine große Fällungskraft in wagerechter Richtung aus, in senkrechter fällt es sehr schwach. Dieser Typus kam bei der Fällung mit reinen chemischen Agenzien überhaupt nicht vor, nur bei einer Mischung des Phenols mit Cuprisulfat.

Das Präzipitin gegen Schafeiweiß bildet eine fast rhomboedrische Form, so wie $Hg^{\cdot\cdot}$ oder $Cd^{\cdot\cdot}$ bei mehreren Eiweißen.

Das Präzipitin gegen menschliche Eiweißkörper fällt in höchster Konzentration des Präzipitins und des Eiweißes; mit abnehmender Konzentration vermindert sich die Fällungskraft besonders in wagerechter Richtung. Es entsteht ein kombinierter Typus der Phenole, namentlich der mehrwertigen.

Das Präzipitin gegen Hundeeiweiß fällt intensiv in der Richtung des verdünnten Eiweißes, weniger in der Richtung des Präzipitins. Es bildet sich ein markanter Phenoltypus.

Das Präzipitin gegen Henneneiweiß fällt wenig in der Richtung des Eiweißes, in wagerechter Richtung aber weit. Einen derartigen Typus beobachtete man bei schwachen organischen Säuren, die auch eine basische Gruppe enthalten.

Obgleich der *Uhlenhut*sche Titer sämtlicher Seren fast derselbe war ($^1/_{4000}$ bis $^1/_{6000}$), unterscheiden sich doch die Bilder der einzelnen

Präzipitine sowohl qualitativ als auch quantitativ wesentlich. Die größte Fällungskraft zeigte sich beim Hunde (85 Felder), obwohl bei dem stärkeren Schafserum nur 21 Felder vorhanden waren. Die geringste Fällungskraft weist das Pferdeserum auf (9 Felder), obwohl sein Titer höher war. Qualitativ überwiegt die Fällung in der Richtung des Eiweißes, so wie es bei den nicht dissoziierten Fällungsmitteln (Phenolen) gefunden wurde. Nur bei einigen findet man eine in beiden Richtungen gleichmäßige Koagulation wie bei H˙ und Hg˙˙-Fällung.

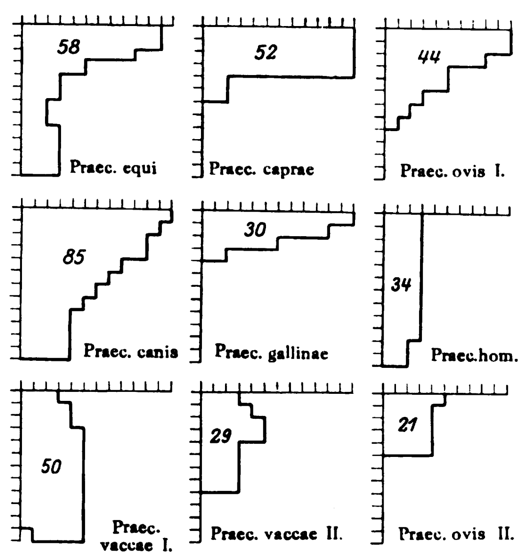


Abb. 1. Der Einfluß der Spezifität des Präzipitinserums auf ein bestimmtes Antigen.

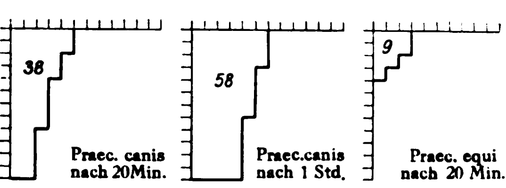


Abb. 2. Der Einfluß der Zeit auf die Ausbildung der gefällten Fläche.

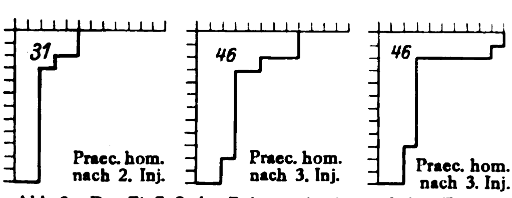


Abb. 3. Der Einfluß der Reimmunisation auf den Typus der flokulierten Zonen.

II. Abteilung.

Der Einfluß der Zeit auf die Tropfenreaktion äußert sich in einer Erweiterung der gefällten Fläche. Im ganzen kann man sagen, daß der im ersten Teile beschriebene Typus unverändert beibehalten bleibt, nur ist er später schon nicht mehr so charakteristisch. Am schärfsten ausgeprägte Bilder entstanden in der Zeit zwischen 15 bis 30 Minuten bei einer Temperatur von 20° im feuchten Thermostaten.

III. Abteilung.

In diesem Teile wurde geprüft, ob sich der Fällungstypus während der Immunisation ändert. Nach der zweiten Injektion ist der Titer auf $^1/_{5600}$ nach *Uhlenhut* gestiegen, und man konnte dabei den bekannten menschlichen Typus beobachten. Nach

der dritten Injektion stieg der Titer auf $^{1}/_{8800}$, aber weder die Fläche noch die Qualität der gefällten Felder waren geändert.

Bei dieser Gelegenheit benutzte ich auch ein älteres Serum und bemerkte eine Abnahme der Fällung in der Richtung des Präzipitins, die durch das Altern des Serums verursacht worden sein kann (siehe *Zemanec*).

Die erreichten Ergebnisse sind von vielen Gesichtspunkten aus interessant.

Hauptsächlich nach der chemischen Seite hin, indem es sich gezeigt hat, daß die Tropfenmethode ein geeignetes Mittel darstellt, um den Chemismus der Präzipitine gegen Antigene zu studieren. Man kann feststellen, daß ihre Reaktionsfähigkeit den chemischen Fällungsmitteln analog ist.

In serologischer Beziehung ist interessant, daß gezeigt werden konnte, daß die im Kaninchen bei der Immunisation durch verschiedene Antigene entstandenen Substanzen qualititiv verschieden sind.

Auf Grund dieser wenigen Versuche kann man zwar kein voreiliges Urteil fällen, denn um eine strenge Gesetzmäßigkeit festzustellen, muß man immer wieder von neuem prüfen und prüfen. Sicher ist jedoch, daß mit Hilfe der Tropfenmethode geprüft werden kann, ob der Typus eines bestimmten, im Kaninchen ausgebildeten Präzipitins immer derselbe bleibt, und daß auf diese Weise ermittelt werden kann, ob das Kaninchen immer denselben Gegenstoff erzeugt. Ferner könnte man so den Einfluß der Gattungsverwandtschaft verfolgen. Und noch weiter wäre klarzustellen, ob ein in verschiedenen Tieren gegen dasselbe Antigen erzeugtes Präzipitin die gleiche Substanz darstellt.

Vom theoretischen Standpunkt wäre es noch wichtig, zu untersuchen, ob der Typus der gefällten Fläche in Anwesenheit verschiedener Elektrolyte und Nichtelektrolyte denselben Veränderungen unterliegt wie bei der Fällung mit chemischen Agenzien.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der Tropfenmethode ist es unter gewissen Umständen möglich, die Präzipitinreaktionen zu studieren.

2. Das Kaninchen erzeugt gegen verschiedene Antigene chemisch untereinander differierende Substanzen.

3. Die Reaktion des Präzipitins gegen menschliche Eiweißkörper verläuft wie die Fällung mit kombinierten, vielwertigen Phenolen. Das Präzipitin gegen Hundeeiweißkörper fällt wie einwertige Phenole. Das Präzipitin gegen Pferdeeiweißkörper wie Mineralsäuren. Das Präzipitin gegen Ziegeneiweißkörper wie die Kombination von Cuprisulfat mit einwertigem Phenol. Das Präzipitin gegen Schafeiweißkörper wie Sublimat. Das Präzipitin gegen Kuheiweißkörper wie Ferrosulfat.

Das Präzipitin gegen Henneneiweißkörper wie schwache organische Säuren.

4. Die Fläche der gefällten Felder erweitert sich mit der Zeit, wobei der Fällungstypus im ganzen unverändert bleibt.

Literatur.

Die vorigen Mitteilungen in dieser Zeitschrift: I. Mitteilung **187**, 456; II. Mitteilung **138**, 326; III. Mitteilung **138**, 335; IV. Mitteilung **145**, 98; V. Mitteilung **148**, 529; VI. Mitteilung **149**, 150. — Biologické spisy vys. školy zvěrolékařské 1922/24. — *J. Bečka* und *V. Zemanec*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 97. — *R. Kraus* und *P. Uhlenhut*, Handbuch der mikrobiologischen Technik 1924. — *W. Kolle* und *A. Wassermann*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Jena 1913. — *A. Ascoli*, Grundriß der Serologie. Wien und Leipzig 1921. — *J. Citron*, Die Methoden der Immundiagnostik und Immuntherapie. Leipzig 1919. — *Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. — *Fröhner*, Lehrbuch der Toxikologie. — *M. Rubinstein*, Traité partique de sérologie et de sérodiagnostik. Paris 1921.

Bemerkungen zu der Arbeit von Graham Lusk: Die Energiequelle bei der Muskelarbeit[1]).

Von

Wilhelm Falta.

(Eingegangen am 8. April 1925.)

In der Arbeit von *G. Lusk*[1]) findet sich auf S. 335 folgende Stelle: Heutzutage ist allgemein in Europa die Meinung — man könnte fast sagen der Irrtum — verbreitet, daß Fett in Kohlehydrat umgewandelt werden könne. Ferner besteht die Ansicht, daß die Entstehung des Diabetes durch eine Überproduktion von Zucker aus Fett bedingt ist. Der hauptsächlichste Ursprung dieses Gedankens rührt von der *v. Noorden*schen Polyglandulärtheorie des Diabetes her. Im Jahre 1908 kam *Falta* nach Amerika und verbreitete die Lehre, daß eine Überproduktion von Adrenalin durch die Nebennieren zur Folge habe, daß die Leber Glykose aus Fett erzeugt usw. Diese Darstellung muß entschieden den Anschein erwecken, daß ich zu den Vertretern der Anschauung einer Zuckerbildung aus Fett beim Diabetes gehöre. Demgegenüber habe ich folgendes zu bemerken:

1. Was die polyglanduläre Theorie des Diabetes anbelangt, so habe ich seit dem Jahre 1908 in allen meinen Arbeiten immer wieder den Standpunkt vertreten, daß die echte diabetische Stoffwechselstörung auf einer Insuffizienz der inneren Sekretion des Pankreas beruhe, und daß andere Blutdrüsen eventuell nur modifizierend einwirken. Ob es auch nichtinsuläre Typen von Diabetes gibt, scheint noch nicht sicher zu sein, doch läßt jedenfalls die Beobachtung von anscheinend außerordentlich seltenen, insulinrefraktären Fällen[2]) diese Möglichkeit offen.

2. Eine Umwandlung von Fett in Zucker beim Diabetes habe ich höchstens in den schwersten, mit Fett überlasteten Fällen für möglich gehalten und schon seit längerer Zeit diese Möglichkeit immer weniger betont. Ich habe vielmehr in immer ausgesprochenerer Weise meine Ansicht dahin formuliert, daß das Pankreasinkret der Assimilation des aus Kohlehydrat und Eiweiß entstehenden Zuckers dient, indem es die Zuckeravidität der Zellen bedingt. Diese Ansicht geht schon daraus hervor, daß in der schon 1908 von mir aufgestellten Formel für den Zuckerwert eines Nahrungsgemisches das Fett ganz unberücksichtigt gelassen wurde, während die Zuckerbildung aus Eiweiß als obligatorisch angesehen wird. In unmittelbarer Folge dieser Anschauung habe

---

[1]) Diese Zeitschr. **156**, 335, 1925.

[2]) Klin. Wochenschr. 1924, S. 1315.

ich mich immer für eine entsprechende Fettzufuhr beim Diabetes eingesetzt und die starke Fettbeschränkung, wie sie lange Jahre in Amerika üblich war, als unzweckmäßig abgelehnt. Die heute in Amerika sehr verbreitete Berechnung des sugar value der Kost unterscheidet sich von meiner Berechnung, die ich seit jener Zeit konsequent durchgeführt habe, nur in unwesentlichen Punkten — ob mit Recht, soll an anderer Stelle[1]) ausführlich besprochen werden. Ich glaube also zu der Behauptung berechtigt zu sein, daß die Darstellung von *G. Lusk*, soweit sie meine Person betrifft, den heutigen Verhältnissen durchaus nicht entspricht.

Eine andere Frage ist die, ob bei der Muskelarbeit ausschließlich Kohlehydrat verbrennt. In dieser Hinsicht verweise ich auf die schon anderenorts mitgeteilte Beobachtung[2]), daß Muskelarbeit den Insulinbedarf eines Diabetikers sicher nicht erhöht, sondern eher herabsetzt. Wenn der Muskel bei seiner Arbeit ausschließlich Zucker verbrauchen würde, so wäre bei der enormen Steigerung des Umsatzes durch Muskelarbeit daher nur die Annahme möglich, daß zum Umsatz von Zucker im Muskel kein Insulin notwendig ist.

---

[1]) Wien. klin. Wochenschr.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1924, S. 1716.

Untersuchungen zur Thrombinlehre Alexander Schmidts.

Mitteilungen über Blutgerinnung Nr. 10.

Von

Edgar Wöhlisch.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 8. April 1925.)

A. Kritische Vorbemerkungen.

Stuber und seine Mitarbeiter vertreten in einer Reihe von Mitteilungen in dieser Zeitschrift die Anschauung, das aus einem Serum durch Alkoholfällung hergestellte Thrombin sei nicht identisch mit dem gerinnungsauslösenden Stoffe des genuinen Serums, vielmehr ein durch die Alkoholeinwirkung erst entstandenes, biologisch bedeutungsloses Kunstprodukt.

Da, wie ich hoffe, die vorliegende Mitteilung eine endgültige Klärung dieser wichtigen Frage herbeiführen wird, so sei auf die Kontroverse, die sich zwischen *Stuber* und mir darüber entsponnen hat, diesmal etwas ausführlicher eingegangen.

Die folgende von *Stuber*[1]) gemachte Beobachtung bildete die Grundlage seiner Auffassung: Eine *Schmidt*sche Thrombinlösung soll auch durch eine eiweißimpermeable Membran hindurch die Gerinnung einer Fibrinogenlösung herbeiführen können, wobei Wasser aus der Fibrinogenlösung zum Thrombin übergehe.

In meiner ersten Nachuntersuchung[2]) der *Stuber-Sano*schen Angaben wies ich von vornherein auf verschiedene Schwierigkeiten hin, die sich für die neue Lehre ergeben. Darunter erwähnte ich vor allem den von *Alexander Schmidt* geführten Nachweis, daß aus einem direkt aus dem Gefäß in Alkohol aufgefangenen Blute — in dem es also gar nicht erst zum Ablaufen des Gerinnungsvorgangs kommt — kein *Schmidt*sches Thrombin gewonnen werden kann. Dieses, nach

---

[1]) *Stuber* und *Sano*, diese Zeitschr. **134**, 260, 1923.
[2]) *Wöhlisch*, ebendaselbst **145**, 279, 1924.

A. Schmidt identisch mit dem gerinnungsaktiven Stoffe des Serums, entstehe eben erst während der Gerinnung.

Ferner wies ich darauf hin, daß der Quellungsdruck *Schmidt*scher Thrombinlösungen nur äußerst klein sein könne, da diese nur spurenweise Eiweiß enthalten. Derartige fast eiweißfreie Thrombinlösungen können trotzdem stark gerinnungsaktiv sein, was den Quellungsdruck als Ursache der Gerinnungsaktivität äußerst unwahrscheinlich mache. Endlich erwähnte ich, daß die minimale, bei den *Stuber*schen Versuchen übergegangene Wassermenge nicht genügen könne, um die Gerinnung des Fibrinogens zu erklären.

Die Versuche ergaben, daß tatsächlich der Quellungsdruck einer fast eiweißfreien aber stark gerinnungsaktiven Thrombinlösung unterhalb der Grenzen der Meßbarkeit liegt. Die betreffenden Messungen wurden auf meine Veranlassung liebenswürdigerweise von den Herren *Schade* und *Clausen* ausgeführt. In eigenen Versuchen konnte ich die *Stuber-Sano*sche Angabe, das Thrombin wirke auch durch eine eiweißimpermeable Membran hindurch, nicht bestätigen.

In einer Arbeit, zusammen mit *Tannhauser*, hielt *Stuber*[1]) seine Befunde und seine Auffassung vom Wesen des Thrombins aufrecht und glaubte die Unrichtigkeit meiner Ergebnisse nachweisen zu können. Die ungenaue Darstellung, welche die beiden Autoren dabei von meiner Arbeitsweise gaben, nötigte mich zu einer Richtigstellung[2]), in der ich am Schluß die Frage stellte, was man eigentlich unter dem von *Stuber* verwendeten „5proz. Thrombin nach *Alexander Schmidt*“ zu verstehen habe. Diese Angabe kehrte nämlich in den *Stuber*schen Arbeiten mehrmals wieder und konnte deshalb nicht als ein Druckfehler angesehen werden, wie ich dies anfangs annahm. Denn der Sinn der Thrombindarstellung nach *A. Schmidt* ist ja gerade die möglichst weitgehende Befreiung des gerinnungsaktiven Stoffes von Eiweiß. Auf etwas anderes als auf den Eiweißgehalt aber konnte die *Stuber*sche Angabe schwerlich bezogen werden, und zwar aus folgenden Gründen: das als Thrombin bezeichnete Trockenpulver ist ein Gemisch aus löslichem Eiweiß, unlöslichem denaturierten Eiweiß und Salzen. Extrahiert man eine bestimmte Menge davon mit Wasser oder Kochsalzlösung, so gehen die Salze und ein ohne weiteres nicht abschätzbarer Teil des Eiweißes in Lösung, und ein mehr oder minder beträchtlicher Teil des Eiweißes bleibt ungelöst zurück und wird abfiltriert. Da die in Lösung gegangenen Salze ja ohne Interesse sind, so ist der einzige in Betracht kommende und auf einfache Weise durch Analyse der Lösung zu ermittelnde Anteil des in Lösung gegangenen eben das Eiweiß. Da indes, wie gesagt, Thrombinlösungen meist nur sehr wenig Eiweiß enthalten, so war die *Stuber*sche Angabe, er verwende 5proz. Thrombinlösungen, völlig unverständlich.

Bald darauf erschien eine weitere Arbeit von *Stuber* und *Sungyong Lee*[3]) über den Nachweis des sogenannten Thrombins im Oxalatplasma.

---

1) *Stuber* und *Tannhauser*, diese Zeitschr. **149**, 374, 1924.
2) *Wöhlisch*, ebendaselbst **153**, 456, 1924.
3) *Stuber* und *Lee*, ebendaselbst **150**, 542, 1924.

Der klassischen Gerinnungslehre nach gerinnt ein Oxalatplasma deshalb nicht, weil es in ihm infolge des Kalkmangels nicht zur Thrombinbildung kommen kann. *Stuber* und *Lee* untersuchten nun derartige Plasmata in der üblichen Weise mittels Alkoholfällung auf ihre Fähigkeit, *Schmidt*sches Thrombin zu liefern. Sie konnten kein Thrombin finden, falls sie die Alkoholfällung in dem oxalathaltigen Plasma direkt vornahmen, sie fanden jedoch Thrombin, falls dem Plasma durch vorherige Dialyse sein Oxalatgehalt entzogen war[1]). Die Autoren zogen hieraus abermals den Schluß, das *Schmidt*sche Thrombin müsse ein Kunstprodukt sein, da es sich ja auch aus einem spontan nicht gerinnungsfähigen Plasma darstellen lasse.

Eine letzte Mitteilung von *Stuber* und *Kuhn*[2]) endlich befaßt sich mit dem Nachweis des sogenannten Thrombins im strömenden Blute. Wie schon *A. Schmidt*, so finden auch *Stuber* und *Kuhn* im Blute keinen absoluten, sondern nur einen relativen Thrombinmangel. Nur wird dieser von den beiden Autoren im Sinne der *Stuber*schen Thrombinlehre durch die ad hoc gemachte Annahme gedeutet, der Alkohol mache vielleicht aus den Zellen gerinnungshemmende Stoffe frei und daher komme es, daß wohl ein Serum, nicht aber das ein ganz andersartiges kolloidchemisches Milieu vorstellende Blut ein gerinnungsaktives Präzipitat liefere. In dieser Arbeit ist auch definiert, was *Stuber* unter einer 5proz. Thrombinlösung versteht. Es heißt auf S. 478: „Wir benutzten zur Extraktion, wie früher, immer 5 g Pulver auf 100 ccm NaCl-Lösung. Nach beendeter Extraktion wurde vom Ungelösten abfiltriert. Unter Thrombin ist deshalb auch in dieser Arbeit immer eine derartige 5proz. Lösung zu verstehen."

Hier wird also in einem Satze festgestellt, daß die Lösung *nicht 5proz. ist*, da ja ausdrücklich angegeben wird, es verbleibe ein unlöslicher Rückstand. Im nächsten Satze wird dann eine derartige Lösung *wieder als 5proz.* bezeichnet. Irgend ein Sinn läßt sich daher mit der *Stuber*schen Angabe des Prozentgehaltes seiner Lösungen nicht verbinden. Der Eiweißgehalt der Thrombinlösungen, der in dieser Arbeit nach *Eßbach* bestimmt worden ist, steht in keinem Zusammenhang mit ihrem „Prozentgehalt": er beträgt (S. 479) bei einigen „5proz. Thrombinlösungen" 4, 6, 8 und 3 Prom.

Ich hatte gehofft, mit der Aufklärung, was unter den *Stuber*schen 5proz. Thrombinlösungen zu verstehen sei, werde sich auch die Ur-

[1]) Die hiermit nunmehr auch von *Stuber* selbst erbrachte Bestätigung der altbekannten Tatsache, daß ein Oxalatplasma auch nach Entfernung des Oxalats nicht gerinnt, ist einer der zahlreichen Beweise gegen die *Stuber*sche Gerinnungslehre, nach welcher das Oxalat die Gerinnung nicht durch Kalkfällung, sondern direkt durch seine Anwesenheit unter Bildung eines Oxalatfibrinogens verhindert. *Stuber* nahm an, daß schon eine bloße Verdünnung eines Oxalatplasmas durch Herabsetzung der Oxalatkonzentration eine Gerinnung herbeiführe. Daß nicht einmal völlige Oxalatentziehung Gerinnung bewirkt, ist bereits vor langer Zeit von *Hammarsten* festgestellt und von diesem Autor mit Recht als ein Beweis gegen die auch von *A. Schmidt* angenommene *direkte* gerinnungsverhindernde Wirkung des Oxalats angesehen worden. Meine Frage (Klin. Wochenschr. **2**, 2318, 1923), wie denn dieser nunmehr sogar von *Stuber* bestätigte fundamentale Versuch *Hammarstens* nach der *Stuber*schen Gerinnungslehre zu deuten sei, ist bisher nicht beantwortet worden.

[2]) *Stuber* und *Kuhn*, diese Zeitschr. **155**, 477, 1925.

sache für den entgegengesetzten Ausfall der *Stuber*schen und meiner Membranversuche mit Sicherheit erbringen lassen. Dies ist nun leider nicht der Fall, da sich der Prozentgehalt des *Stuber*schen Thrombins eben nicht auf das Eiweiß bezieht. Indessen möchte ich doch wenigstens meine Vermutungen darüber äußern, in welcher Richtung die Ursache für den verschiedenen Ausfall der *Stuber*schen und meiner Membranversuche zu suchen sein dürfte.

Aus den Angaben der Tabelle VII auf S. 383 der Arbeit von *Stuber* und *Tannhauser* geht hervor, daß die zu den Membranversuchen verwendeten Fibrinogenlösungen 7,5, 7,5, 3,75 und 2,5 Prom. Eiweiß enthalten haben. Unglücklicherweise ist gerade in dieser Arbeit der Eiweißgehalt der zu den Dialysen gegen Fibrinogen verwendeten Thrombinlösungen nicht bestimmt worden. Man kann darüber also nur auf Grund der oben erwähnten Zahlen aus der Arbeit von *Stuber* und *Kuhn* Vermutungen äußern, wenn man annimmt, daß die Darstellungsweise des Thrombins in beiden Arbeiten ungefähr die gleiche war. Nun ist aber der weiter oben wiedergegebene Eiweißgehalt der Thrombinlösungen von derselben Größenordnung wie der der Fibrinogenlösungen. Der von *Stuber* in seinen Membranversuchen nachgewiesene Quellungsdruck seines Thrombins erklärt sich also mit größter Wahrscheinlichkeit durch dessen hohen Eiweißgehalt. Zu meinen Membranversuchen wurden dagegen Thrombinlösungen verwendet, die nur spurenweise Eiweiß enthielten — wie dies der Sinn der Thrombindarstellung nach *A. Schmidt* ist —, und ich konnte demgemäß keine Quellung des Thrombins bei der Dialyse gegen Fibrinogen nachweisen, obwohl meine Thrombinlösungen stark gerinnungsaktiv waren. Die Verwendung stark eiweißhaltiger Thrombinlösungen dürfte also *Stuber* und seine Mitarbeiter zu dem Trugschluß verleitet haben, daß die Gerinnungsaktivität des *Schmidt*schen Thrombins durch dessen Quellungsdruck bedingt sei. Da Herrn *Stuber* an der Aufklärung unserer Differenz gelegen sein dürfte, so möchte ich ihn bitten, seine Membranversuche doch einmal mit fast eiweißfreiem, obwohl stark gerinnungsaktivem Thrombin und unter Angabe des Eiweißgehalts sowohl des Thrombins wie des Fibrinogens zu wiederholen.

Derselbe Effekt der Wasseranziehung durch eine Membran hindurch müßte sich übrigens bemerkbar machen, wenn man ein Serum, das gegen 7 Proz. Eiweiß enthält, einer Fibrinogenlösung mit ihrem geringen Eiweißgehalt gegenüberstellt. Dieser Kontrollversuch ist indes von *Stuber* noch niemals angestellt worden. Irgend einen Beweis für eine Verschiedenheit der Wirkungsweise des Serums und des *Schmidt*schen Thrombins hat *Stuber* durch seine Membranversuche bisher also nicht erbracht.

Indes sind alle die zuletzt hier erörterten Fragen von sekundärer Wichtigkeit, da sich die Entscheidung unserer Hauptfrage: „*Ist das Schmidtsche Thrombin identisch mit dem Serumthrombin?*“ mit völliger Sicherheit durch ganz andersartige einfache Versuche erbringen läßt, wie sogleich zu besprechen sein wird.

Wir kommen hiermit zur Kritik der *Stuber*schen Versuche über den Nachweis des *Schmidt*schen Thrombins im Oxalatplasma.

Stuber und sein Mitarbeiter machen über die Gerinnungszeiten ihrer Fibrinogenlösungen bzw. Oxalatplasmen unter Einwirkung des aus oxalatfrei dialysiertem Oxalatplasma hergestellten *Schmidt*schen Thrombins die folgenden Angaben (S. 546, Tabelle V): 24, 12, 3. 24 Stunden; 4 Tage; 48, 24, 48, 48, 12, 1, 6 Stunden; 4 Tage; 48, 24. 24 Stunden.

Ich kann nur sagen, daß ich aus diesen Angaben den entgegengesetzten Schluß ableiten würde wie *Stuber*. Denn die mitgeteilten Gerinnungszeiten sind in der überwiegenden Mehrzahl so außerordentlich groß, daß die auslösenden Thrombinmengen nur minimal kleine gewesen sein können. Mit einem aus Serum dargestellten *Schmidt*schen Thrombin läßt sich ja bekanntlich oft schon in wenigen Minuten eine kräftige Gerinnung auslösen (vgl. hierzu den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit).

Die Anwesenheit minimaler Thrombinmengen im Oxalatplasma ist aber ohne weiteres zu erwarten und besagt natürlich nicht das geringste gegen die klassische Gerinnungslehre. Wird man doch auch durch noch so vorsichtiges Manipulieren bei der Blutentnahme — Paraffinieren der Kanüle usw. — sicherlich die Thrombinbildung nicht völlig verhindern können, ehe das Blut durch das Auffangen in Oxalat nicht entkalkt ist. Möglicherweise sind ja auch schon im strömenden Blute minimale Thrombinmengen vorhanden, die dort vielleicht durch irgendwelche Antikörper paralysiert werden.

Eine Entscheidung der ganzen Frage ist nun in sehr einfacher Weise dadurch zu erbringen, daß man ein Plasma und ein Serum des gleichen Tieres quantitativ vergleichend auf ihre Fähigkeit, *Schmidt*sches Thrombin zu liefern, untersucht. Es ist unverständlich, daß weder *Stuber* noch sein Mitarbeiter darauf gekommen ist, diesen zur Entscheidung einer so wichtigen Frage der Gerinnungsphysiologie unbedingt notwendigen Kontrollversuch anzustellen. Auch haben sie keine Versuche darüber ausgeführt, ob es wirklich lediglich das Oxalat ist, was den negativen Ausfall des Thrombinnachweises in einem oxalathaltigen Oxalatplasma bewirkt.

B. Experimenteller Teil.

Die eigenen Versuche bestanden in der Hauptsache in einer Ergänzung der *Stuber*schen Oxalatplasmaversuche durch die entsprechenden Serum-

kontrollen (Versuche 3 bis 7). Sie wurden vervollständigt durch einige weitere Versuche, die dartun sollen, daß Eingriffe, welche die Gerinnungsaktivität des frischen Serums im Sinne einer Steigerung oder Herabsetzung verändern, eine gleichsinnige Veränderung seiner Fähigkeit, *Schmidt*sches Thrombin zu liefern, bewirken (Versuche 1 und 2).

Versuch 1.

Bekanntlich nimmt die Gerinnungsaktivität eines frischen Serums beim Stehen sehr schnell ab: das Serumthrombin geht dabei in eine unwirksame Modifikation über, die von *Morawitz* als Metathrombin bezeichnet wird. Falls das *Schmidt*sche Thrombin mit dem Thrombin des frischen Serums identisch wäre, so müßte sich aus einem gealterten Serum weit weniger *Schmidt*sches Thrombin gewinnen lassen als aus einem frischen, während dies nach der *Stuber*schen Lehre nicht der Fall zu sein brauchte.

Von einem Rinderserum wurde der eine Teil sofort nach der Gewinnung in der üblichen Weise mit dem 20fachen Volumen absoluten Alkohols gefällt: Thrombin I. Ein weiterer Teil desselben Serums wurde erst 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann in der gleichen Weise gefällt: Thrombin II. Beide Eiweißfällungen blieben 8 Wochen unter Alkohol stehen. Darauf Abfiltrieren des Alkohols und Trocknung des Präzipitats im Vakuumexsikkator.

Zur Herstellung der Thrombinlösung wurden je 0,06 g des Eiweißpulvers mit 6,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung etwa 1 Stunde lang extrahiert, danach filtriert.

Als Reagens auf Thrombin diente eine aus Pferdeoxalatplasma hergestellte Fibrinogenlösung.

Je 0,5 ccm Fibrinogenlösung wurden mit 0,8 ccm der verschiedenen Lösungen von *Schmidts* Thrombin versetzt. Jeder Versuch wurde in doppelter Ausführung angestellt.

Thrombin I: Nach **33 Minuten** Flockung, nach **50 Minuten** feste Erstarrung des Fibrinogens.

Thrombin II: Flockung nicht beobachtet, erst nach etwa **6 Stunden** feste Erstarrung.

Der Versuch entsprach ganz den Erwartungen, insofern als aus dem frischen Serum tatsächlich ein weit wirksameres Thrombin zu gewinnen war als aus dem gealterten Serum.

In der Literatur begegnet man der Angabe, der Alkohol habe die Fähigkeit, das Metathrombin zu reaktivieren. Es dürfte ratsam sein, sich auf diese Fähigkeit nicht allzusehr zu verlassen und sich zur Herstellung möglichst kräftigen Thrombins eines ganz frischen Serums zu bedienen.

Versuch 2.

Durch Zusatz eines Organextraktes — Thrombokinase von *Morawitz* — zu einem Serum läßt sich bekanntlich dessen Gerinnungsaktivität erheblich steigern. Es findet in Gegenwart von Ca-Ionen eine Neubildung von Thrombin aus der als Prothrombin bezeichneten Vorstufe statt.

Ist das *Schmidt*sche Thrombin mit dem Thrombin des Serums identisch, so müßte sich aus einem mit Thrombokinase aktivierten Serum ein wirksameres *Schmidt*sches Thrombin gewinnen lassen als aus einem nicht aktivierten Serum.

Ein Teil eines frischen Pferdeserums wurde mit einem nach *Morawitz* aus frischer entbluteter Niere hergestellten wässerigen Organextrakt, die

Serumkontrolle mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers versetzt. Nach 5 Minuten langer Einwirkung der Thrombokinase wurden beide Sera mit Alkohol gefällt. Aufbewahrung unter Alkohol 8 Wochen.

Zur Herstellung der Thrombinlösungen wurden je 0,153 g der beiden Eiweißpulver mit 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung extrahiert. Als Reagens auf Thrombin diente ein 2prom. Rinderoxalatplasma, das im Verhältnis 1 : 4 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt war.

Je 0,5 ccm der Plasmaverdünnung wurden mit 1,0 ccm Thrombinlösung versetzt. Doppelversuch:

Thrombokinase-Thrombin: Nach **3 Minuten** Beginn der Gerinnung, nach **6½ Minuten** feste Erstarrung.

Normal-Thrombin: Nach **6½ Minuten** Beginn der Gerinnung, nach etwa **12 Minuten** erst feste Erstarrung.

Ganz wie nach der klassischen Gerinnungslehre zu erwarten, liefert also das mit Thrombokinase aktivierte Serum ein wesentlich wirksameres *Schmidt*sches Thrombin als das nicht aktivierte Normalserum.

Versuch 3.

In diesem Versuch sollte die Fähigkeit eines Oxalatplasmas, *Schmidt*sches Thrombin zu liefern, quantitativ verglichen werden mit der Fähigkeit eines aus demselben Plasma gewonnenen Serums. Der klassischen Gerinnungslehre nach müßte das Serum ein weit wirksameres *Schmidt*sches Thrombin liefern als das Plasma, während sich nach *Stuber* keine Unterschiede nachweisen lassen dürften.

Ein 2prom. Pferdeoxalatplasma wurde durch Dialyse gegen physiologische NaCl-Lösung oxalatfrei gemacht, da ja nach *Stuber* das Oxalat die Fähigkeit des Plasmas, *Schmidt*sches Thrombin zu liefern, vernichten soll. Nach Entfernung des Oxalats wurde die eine Hälfte des Plasmas durch Zugabe von etwas $CaCl_2$-Lösung zwecks Serumgewinnung zur Gerinnung gebracht. Nach Entfernung des Gerinnsels wurde das gewonnene Serum zur Entziehung des Kalkes weiter dialysiert, um auch bezüglich des Salzgehaltes in Plasma und Serum völlig gleiche Bedingungen herzustellen. Auch das Plasma dialysierte während dieser Zeit weiter. Nach völliger Ca-Freiheit des Serums wurde sowohl dieses wie auch das Plasma mit Alkohol gefällt. Die Fällungen wurden 4 Wochen unter Alkohol aufbewahrt. Die Produkte seien als Serum-Thrombin bzw. Plasma-Thrombin bezeichnet.

Zur Herstellung der Thrombinlösungen wurden je 0,07 g des Eiweißpulvers mit 5,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung extrahiert. Reagens auf Thrombin war ein im Verhältnis 1 : 3 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünntes Pferdeoxalatplasma.

Je 1,0 ccm der Plasmaverdünnung wurde mit 1,0 ccm Thrombinlösung versetzt. Doppelversuch:

Serum-Thrombin: Nach **1½ Stunden** feste Gerinnung.

Plasma-Thrombin: Glas I nach **12 Stunden** geronnen, Glas II nach etwa **24 Stunden**.

Auch dieser Versuch bestätigt die klassische Thrombinlehre, da das Serum ein weit wirksameres *Schmidt*sches Thrombin liefert als das Plasma. Der Versuch ist eine direkte Widerlegung der *Stuber*schen Thrombinlehre.

Die folgenden Versuche haben denselben Zweck wie Versuch 3, nur ist die Versuchsanordnung eine etwas andere. Da nämlich in Versuch 3 das Serum nicht in frischem Zustande, sondern erst nach längerer Dialyse

gefällt wurde, so war es denkbar, daß durch den hierbei eintretenden Thrombinverlust eine Art Ausgleich der Serumeigenschaften gegenüber den Plasmaeigenschaften stattfinden könnte, und daß die Unterschiede zwischen Serum-Thrombin und Plasma-Thrombin noch weit deutlicher in Erscheinung treten würden, wenn man Serum und Plasma frisch auf Thrombin verarbeitete. Um hierbei Serum und Plasma unter ganz gleichen Bedingungen zu haben, muß dem Serum vor der Alkoholfällung die gleiche Menge Oxalat zugesetzt werden, die das Plasma enthält. Die Entfernung des Oxalats hat durch Dialyse der fertigen *Schmidt*schen Thrombinlösungen zu geschehen; diese Arbeitsweise ist vorteilhafter, da man weiß, daß eiweißarme *Schmidt*sche Thrombinlösungen sich unbeschadet ihrer Gerinnungsaktivität weit längere Zeit aufbewahren lassen als frisches Serum.

Versuch 4.

Von einem Pferde wird 2prom. Oxalatplasma sowie frisches Serum durch Auszentrifugieren des defibrinierten Blutes gewonnen. Dem Serum werden ebenfalls 2 Prom. Natriumoxalat zugesetzt. Sodann werden Plasma und Serum in völlig frischem Zustande mit Alkohol gefällt. Aufbewahrung unter Alkohol 6 Wochen. Die Produkte sollen wieder als Serum-Thrombin und Plasma-Thrombin bezeichnet werden.

Je 0,06 g des Eiweißpulvers werden mit 6,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen, längere Zeit gut durchgerührt und sodann, ohne zu filtrieren, in Kollodiumhülsen zwecks Entfernung des Oxalats 24 Stunden gegen mehrmals gewechselte physiologische NaCl-Lösung dialysiert. Danach erwiesen sich die Extrakte als oxalatfrei. Vor Verwendung der Lösungen wurde der unlösliche Rückstand natürlich abfiltriert. Als Reagens auf Thrombin diente eine aus Pferdeoxalatplasma hergestellte Fibrinogenlösung.

Je 0,6 ccm Fibrinogenlösung wurden mit 1,0 ccm Thrombinlösung versetzt. Doppelversuch:

Serum-Thrombin: Nach **25 Minuten** Beginn der Gerinnung, nach **40 Minuten** feste Erstarrung.

Plasma-Thrombin: Nach **36 Stunden** ist der Inhalt beider Gläser des Versuchs noch völlig **flüssig**, auch nach noch längerer Zeit ist eine eigentliche Gerinnung nicht zu beobachten.

Der ganze Versuch wurde darauf nochmals mit gleichem Erfolge wiederholt.

Wie erwartet, war also tatsächlich bei dieser Art der Versuchsanordnung der Unterschied zwischen Serum und Plasma weit größer als bei der Versuchsanordnung nach Versuch 3.

Der folgende Versuch soll die Frage entscheiden, ob tatsächlich die Beimengung von Oxalat zu einem frischen Serum imstande ist, dieses seiner Fähigkeit zur Lieferung *Schmidt*schen Thrombins zu berauben: *Stuber* gab ja an, daß sich aus einem Plasma Thrombin nur nach vorheriger Entfernung des Oxalats gewinnen lasse.

Versuch 5.

Je 0,06 g der auch in Versuch 4 verwendeten Thrombinpulver wurden mit 6,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung längere Zeit extrahiert, jedoch diesmal nicht dialysiert, sondern in oxalathaltigem Zustande verwendet. Als Reagens diente wieder eine Fibrinogenlösung. Je 0,5 ccm Fibrinogenlösung wurden mit 0,8 ccm Thrombinlösung versetzt.

Serum-Thrombin (oxalathaltig): Nach **14 Minuten** Beginn der Gerinnung, nach **25 Minuten** feste Erstarrung.

Plasma-Thrombin (oxalathaltig): Nach **30 Stunden** in beiden Gläsern zarte Gerinnsel.

Auch aus oxalathaltigem Serum lassen sich also sehr stark wirksame Thrombinlösungen nach *A. Schmidt* gewinnen, und man braucht daher das Oxalat überhaupt nicht zu entfernen, wenn man die enormen Unterschiede des Thrombingehalts von Serum und Plasma demonstrieren will. Daß sich das Oxalat bei den *Stuber*schen Versuchen zum Nachweis des *Schmidt*schen Thrombins im Plasma störend bemerkbar machte, ist ein eklatanter Beweis dafür, daß es sich hier eben nur um die Anwesenheit minimalster Mengen von Thrombin gehandelt hat.

Versuche 6 und 7.

Über diese beiden Versuche sei der Kürze halber summarisch berichtet. Es wurde nochmals frisches Serum eines weiteren Pferdes nach Oxalatzusatz mit einem Oxalatplasma desselben Tieres und frisches Serum eines Rindes nach Oxalatzusatz mit dem Oxalatplasma dieses Rindes auf seinen Gehalt an *Schmidt*schem Thrombin verglichen. Die Aufbewahrung unter Alkohol geschah diesmal nur 24 Stunden. Die Thrombinlösungen wurden, wie in Versuch 5, oxalathaltig verwendet. Doppelversuch:

Pferdeserum-Thrombin: Nach **15 Minuten** Erstarrung.

Pferdeplasma-Thrombin: Nach **12 Stunden** Erstarrung.

Rinderserum-Thrombin: Nach **10 Minuten** Erstarrung.

Rinderplasma-Thrombin: Nach **12 Stunden** Erstarrung.

C. Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche sind sämtlich vollständig eindeutig ausgefallen.

Sie zeigen, daß die Wirkungsstärke der *Schmidt*schen Thrombinlösungen in unzweifelhafter Abhängigkeit steht von der Gerinnungsaktivität des zu ihrer Darstellung verwendeten Ausgangsmaterials. Stark gerinnungsaktives Serum liefert viel, schwach gerinnungsaktives Serum liefert wenig *Schmidt*sches Thrombin, und das spontan überhaupt nicht gerinnende Oxalatplasma liefert nur minimale Spuren dieser Substanz, wie sie auch *Stuber* und *Lee* gefunden haben.

Meine Ergebnisse stehen also in schönster Übereinstimmung mit dem Befunde *Alexander Schmidts*, daß frisches, direkt aus der Ader in Alkohol aufgefangenes Blut im Gegensatz zum Serum nur Spuren Thrombins liefert. Die Annahme *Stubers*, diese Beobachtung *A. Schmidts* erkläre sich vielleicht dadurch, daß der Alkohol aus den Blutzellen gerinnungshemmende Stoffe frei mache, kann wegen des mit dem frischen Blute übereinstimmenden Verhaltens des zellfreien Plasmas nicht aufrechterhalten werden. Der rein qualitative Nachweis von Thrombin im Plasma, wie ihn *Stuber* erbracht hat, ist für die Entscheidung unserer Frage bedeutungslos. Nur aus einer quantitativen Vergleichung, wie sie seinerzeit von *A. Schmidt* und in der vorliegenden

Arbeit vorgenommen wurde, können irgendwelche Schlüsse gezogen werden.

Diese lauten, daß *das Schmidtsche Thrombin kein biologisch bedeutungsloses Kunstprodukt ist. Es ist vielmehr identisch mit jenem biologisch äußerst wichtigen, seiner Natur nach noch unbekannten Stoffe des Serums — dem Serumthrombin —, der sich zum weitaus größten Teile erst nach dem Austritt des Blutes aus den Gefäßen bildet und dadurch die Gerinnung herbeiführt.*

Es ist bisher kein einziger Befund bekannt, der sich nicht mit dieser klassischen Lehre *A. Schmidts*, des Entdeckers des Thrombins, in Übereinstimmung bringen ließe.

Zusammenfassung.

Quantitativ vergleichende Thrombinbestimmungen zeigen, daß die Wirkungsstärke *Schmidt*scher Thrombinlösungen in unzweifelhafter Abhängigkeit von der Gerinnungsaktivität des zu ihrer Herstellung verwendeten Ausgangsmaterials steht. Insbesondere wird gezeigt, daß frisches Serum ein sehr wirksames *Schmidt*sches Thrombin liefert, während sich aus einem Plasma desselben Tieres nur Spuren dieser Substanz gewinnen lassen. Die Thrombinlehre *Stubers* muß daher abgelehnt, die Lehre *Alexander Schmidts* als richtig angesehen werden.

Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute.

III. Mitteilung:

Die Entstehung des Blutammoniaks.

Von

J. K. Parnas und **M. Taubenhaus** (Wien).

[Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 9. April 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

In den früheren Mitteilungen[1]) wurde die Ammoniakbildung im Blute beschrieben und auch der Versuch gemacht, die Art der Muttersubstanz des Ammoniaks kennenzulernen. Es wurde gefunden, daß im Kaninchenblut, an welchem sich die Ammoniakbildung am besten studieren läßt, der Ammoniakbildung von 2 mg in 100 g Blut keine merkliche Zunahme im Stickstoffgehalt des enteiweißten Blutes entspricht. Ferner wurde sowohl am harnstoffreichen Kaninchenblut als auch am sehr harnstoffarmen Vogelblut festgestellt, daß der Harnstoffgehalt während der Ammoniakbildung keine Änderung erfährt. Da die Ammoniakbildung mit der Enteiweißung des Blutes aufhört, beziehen wir sie auf die Einwirkung eines Ferments, das hauptsächlich in den roten Blutkörperchen konzentriert ist, auf eine nichtkolloide Muttersubstanz, die somit zu der Gruppe des „Reststickstoffs" gehört.

Diese Frage ist bereits früher von *A. Rohde* bearbeitet worden[2]). Die Verfasserin stellte am Hundeblut fest, daß im sterilen, mit Chloroform oder Toluol aufbewahrten Blute auch bei 0^0 Ammoniakbildung stattfindet, daß im Dialysat aus dem strömenden Blute (nach *Abels* Vividiffusionsmethode) Ammoniak vorhanden ist, aber nicht im Dialysat entsteht, sondern nur aus dem Blute herausdiffundiert. Die Werte, welche

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 1, 1924; **155**, 247, 1925.

[2]) Journ. of biol. Chem. **21**, 325, 1915.

A. Rohde für die Ammoniakbildung im Hundeblut angibt, sind von denjenigen weit entfernt, welche *Parnas* beobachten konnte. Sie findet nach 24 Stunden bei 0° und 3 Stunden bei Zimmertemperatur einen Ammoniakgehalt von 1,78 mg-Proz., während nach *Parnas* die Ammoniakbildung im Hundeblut sehr langsam fortschreitet und der Gehalt nach 27 Stunden bei 17° nur 0,18 mg-Proz. beträgt.

Die Versuche von *A. Rohde* werden in dem Sinne gedeutet, daß das Blutammoniak aus den kolloiden Blutbestandteilen entsteht. *J. Feigl* und *W. Weise* äußern sich darüber folgendermaßen[1]:

„Eine wichtige theoretische Frage haben wir zu erörtern. Man bezeichnet das Ammoniak als Teilerscheinung des Gesamtreststickstoffs. Das ist, wie *Alice Rohde* fand, nur zum Teil richtig, da es außer Zweifel steht, daß Ammoniak teilweise auch an kolloide Komplexe gebunden ist und aus diesen langsam und in Spuren frei gemacht wird."

Die Frage, ob das Ammoniak im Blute aus nichtkolloiden oder kolloiden Bestandteilen entsteht, war für uns schon deshalb von besonderer Wichtigkeit, weil Versuche zur Ermittlung seiner Muttersubstanz nur im ersteren Falle Aussicht auf Erfolg haben könnten. Wir haben diese Frage in den folgenden Versuchen aufgenommen:

1. Es wurde in mehreren Versuchen der Stickstoffgehalt des enteiweißten Blutes vor und nach Ablauf der Ammoniakbildung bestimmt. Das Ergebnis der mit aller Sorgfalt ausgeführten Bestimmungen war dasselbe wie das von *Parnas* und *Heller* mitgeteilte; der Ammoniakbildung entspricht im Kaninchenblut keine Erhöhung des Stickstoffs nichtkolloider Bestandteile[2]).

2. Es wurde geprüft, ob während der Ammoniakbildung eine Änderung in der Aminosäurenfraktion des Blutes stattfindet. Auch hier wurde im Kaninchenblut keine Änderung beobachtet. Somit scheint *die Muttersubstanz des Ammoniaks*, da Harnstoff und Aminosäuren entfallen, Harnsäure und Kreatin aber nicht in Frage kommen, *zu der engeren Gruppe des unaufgeklärten Reststickstoffs zu gehören.*

3. Es wurde schließlich direkt geprüft, ob in der enteiweißten Blutflüssigkeit eine Substanz vorhanden ist, aus der Vollblut Ammoniak entwickeln kann. Das Ergebnis dieses Versuchs war vollständig klar: wenn wir das Filtrat aus dem enteiweißten Blute im Vakuum auf das ursprüngliche Blutvolumen einengten und zu Proben frischen Blutes hinzufügten, so entwickelten sich in diesen Blutproben bedeutend

---

[1]) Handb. d. biol. Arbeitsmeth., herausgegeben von *Abderhalden*, Abt. IV, Teil 4, S. 754, 1924.

[2]) Im Vogelblut sind infolge des sehr hohen Stickstoffgehalts (80 mg-Proz. im Taubenblut) die Bedingungen für solche Versuche sehr ungünstig. Doch wurde auch hier keine Erhöhung gefunden, wenn das Blut 48 Stunden bei 37° blieb.

größere Ammoniakmengen, als in Proben desselben Blutes, die mit Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen aufgefüllt worden sind. Wir erinnern daran, daß der Zusatz von Harnstoff zum Blute die Ammoniakbildung nicht fördert, der Zusatz von Ammoniaksalzen die Ammoniakbildung nicht hemmt. Die beobachteten Unterschiede beziehen sich *nicht auf die Geschwindigkeit der Ammoniakbildung, sondern auf den konstanten Endwert im sterilen Blute.*

Damit scheint uns der Nachweis geführt zu sein, *daß die Muttersubstanz des Blutammoniaks zu den nichtkolloiden Bestandteilen des Blutes gehört.* Es eröffnet sich damit auch die Aussicht auf die Auffindung eines unbekannten Bestandteiles des *Reststickstoffs*, der mit etwa 2 mg-Proz. N vorläufig als ammoniakbildende Substanz in Rechnung zu stellen ist.

Die Fraktionierung des Stickstoffs des enteiweißten Blutes, die bis jetzt die Bestimmung von Harnstoff, Ammoniak, Harnsäure, Kreatin und Kreatinin und der Aminosäuren umfaßt, wäre noch um die Bestimmung der ammoniakbildenden Substanz zu erweitern. Die Methode dafür ergibt sich aus folgendem: man bestimmt den Ammoniakstickstoff im frischen Blute und nachdem das Blut 24 Stunden lang bei 37° gestanden ist. Die Differenz ergibt den Stickstoff (genauer gesagt, den abspaltbaren Stickstoff) der ammoniakbildenden Substanz. Welche klinische und physiologische Bedeutung dieser Fraktion zukommen mag, läßt sich zunächst nicht voraussehen.

II.

Über die Methoden der Blutentnahme und Behandlung, sowie über die Ammoniakbestimmung im Blute ist gegenüber den früheren Mitteilungen nichts hinzuzufügen. Die Ammoniakbestimmung wurde so ausgeführt, wie in der zweiten Mitteilung beschrieben worden ist; sie scheint in dieser Fassung keine Schwierigkeiten und keine Fehlerquellen mehr zu haben, und wir konnten uns auch überzeugen, daß sie auch für wenig Geübte leicht zu erlernen ist. In einem Destillationskolben sind Hunderte von Destillationen ausgeführt worden.

Besondere Aufmerksamkeit haben wir der Methodik der Gesamtstickstoffbestimmung im enteiweißten Blute gewidmet. Es kam in unseren Versuchen darauf an, den Fehler möglichst einzuschränken, denn die Ammoniakbildung macht im ganzen nur 5 Proz. des Gesamtstickstoffs aus. Wir haben aus diesem Grunde auch die Frage nach der relativen Genauigkeit der kolorimetrischen und der maßanalytischen Stickstoffbestimmung erneut geprüft.

Trotz der hervorragenden Erfolge der kolorimetrischen und nephelometrischen Methoden, die besonders in der physiologischen Chemie ganz neue Arbeitsgebiete eröffnet haben, fehlt es immer noch nicht an Stimmen, welche eine diesen Methoden im Vergleich mit den gravimetrischen und maßanalytischen anhaftende Mindergenauigkeit betonen.

Ein hervorragender Biochemiker spricht gelegentlich der Besprechung eines Buches von den „kolorimetrischen Methoden, welche augenblicklich besonders in Amerika so sehr beliebt sind, aber nur im Einzelfall zuverlässige Ergebnisse gewährleisten". In einer jüngsten Publikation von *F. Holtz* und *W. H. Kullmann*[1]) äußern sich die Autoren direkt wegwerfend über diese Methoden[2]). Und dabei hat doch die Anwendung der nephelometrischen Korrektur zu der gravimetrischen Silberbestimmung in den Atomgewichtsbestimmungen von *Richards* und seiner Schule die Exaktheit der Bestimmungen gegenüber den rein gravimetrischen gesteigert!

Wer kolorimetrische Methoden verwendet und einige Erfahrung über deren Anwendung besitzt, wird den wegwerfenden Urteilen nicht beistimmen. Kolorimetrische Methoden haben Fehlerquellen, wie sie gravimetrische und maßanalytische Methoden auch haben; wie es Begleitstoffe gibt, welche die Färbung beeinflussen, so gibt es solche, welche mit in Niederschläge übergehen, und ebenso, wie beim Fällen bestimmte Konzentrationen eingehalten werden müssen, damit der Niederschlag rein und vollständig ausfällt, so müssen bestimmte Verdünnungen eingehalten werden, damit die Proportionalität zwischen Konzentration und Farbtiefe bestehen bleibt. Die kolorimetrischen Methoden müssen nur ebenso sorgfältig ausgearbeitet und angewandt werden wie die gravimetrischen und maßanalytischen, und das Gebiet ihrer Anwendbarkeit muß genau bestimmt werden.

Bei unseren Ammoniakbestimmungen werden in der Analyse Mengen von 0,001 bis 0,02 mg bestimmt, in den Bestimmungen des Reststickstoffs gegen 0,4 mg. Welche Bestimmungsmethode war in diesem Gebiet anzuwenden, die kolorimetrische oder die maßanalytische?

E. R. Allen und *B. S. Davisson* haben die Frage der Anwendbarkeit beider Methoden in einer sorgfältigen kritischen und experimentellen Arbeit untersucht[3]). Das Resultat ist sehr interessant: wenn Ammoniakmengen von etwa 0,1 mg N bestimmt werden, so ist die kolorimetrische Bestimmung etwas genauer (d. h. ihr wahrscheinlicher Fehler ist ein wenig geringer) als bei der maßanalytischen. Von Mengen von 0,5 mg N angefangen, ist dagegen die maßanalytische Methode viel genauer. Wir geben die Resultate von *Allen* und *Davisson* wieder.

Tabelle I.

Analytische N-Menge mg	Kolorimetrie (*Nessler*)		Maßanalyse (acidimetrisch)	
	wahrscheinl. Fehler mg	Fehler Proz.	wahrscheinl. Fehler mg	Fehler Proz.
0,20	0,0029	1,80	0,0022	2,06
0,50	0,0107	2,10	0,0022	0,38
1,00	1,0114	1,10	0,0035	0,38

In unseren Versuchen wurden beide Methoden auf noch kleinere Stickstoffmengen angewandt. Bei der kolorimetrischen Bestimmung wurde im *Wolff*schen und in dem *Buerker*schen Kolorimeter (der Firma *Leitz*, Wetzlar) kolorimetriert; titriert wurde aus einer *Daffert*schen Bürette

[1]) Ber. über d. ges. Physiol. **10**, 332, 1922.
[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **58**, 266, 1925.
[3]) Journ. of biol. Chem. **40**, 183, 1919.

(mit geschlossenem Reservoir, Bürette in $^{1}/_{100}$ ccm geteilt, $^{1}/_{100}$ ccm entspricht etwa 1,5 mm Teilstrichentfernung) mit n/100 NaOH, mit neutraler Methylrotindikatorlösung.

Es mag noch hinzugefügt werden, daß der eine von uns (*Taubenhaus*) relativ farbenblind (deuteranop) ist. Es war interessant zu prüfen, wie weit unter diesen Umständen die Sicherheit der kolorimetrischen Ablesung reicht.

Die Resultate seien kurz zusammengefaßt: Es wurden Ammoniakmengen bestimmt, die je 1 ccm einer m/10000, einer m/1000, einer m/100 NH_3-Lösung entsprechen. Diese Mengen waren in je 10 ccm Wasser gelöst. Bei der Bestimmung von 0,001375 mg Ammoniak im *Wolff*schen Kolorimeter gegen eine Standardlösung mit 0,002 mg N beträgt beim farbenblinden Beobachter die maximale Abweichung vom Mittelwert aus zehn Beobachtungen 2,25 Proz. des Gesamtwertes, die mittlere Abweichung ± 1,56 Proz., die kleinste Abweichung ± 0,45 Proz. Diese Ammoniakmengen mit n/100 NaOH zu titrieren, haben wir nicht versucht, für das *Buerker*sche Kolorimeter sind so farbschwache Lösungen nicht geeignet, da die Schichtdicke zu klein ist und die Okularvergrößerung des Feldes die Färbung abschwächt. Es mag also festgestellt werden, daß bei der von uns angewandten Methode der Ammoniakbestimmung mit dem *Wolff*schen Kolorimeter, in welchem die zu bestimmende Ammoniakmenge mit ihrer ganzen Menge zur Farbwirkung gelangt, auch bei dem farbenblinden Beobachter der wahrscheinliche Fehler[1]) der einzelnen kolorimetrischen Ablesung bei Mengen von 0,001 mg nicht mehr beträgt als ± 4,5 Proz. des Gesamtwertes[2]).

Das Optimum der kolorimetrischen Ammoniakbestimmung mit dem *Nessler*schen Reagens liegt bei Mengen, welche etwa 1 ccm einer n/1000 NH_3-Lösung in 10 ccm enthalten. Bei der Bestimmung solcher Mengen las der farbentüchtige Beobachter im *Buerker*schen Kolorimeter überhaupt stets die gleichen Schichtdicken ab: wenn z. B. als Standard eine Ammonsulfatlösung mit 0,01 mg Stickstoff und 10 mm Schichtdicke diente, so wurde sechsmal nacheinander 6,9 mm für die gemessene Ammoniaklösung mit 1 ccm n/1000 NH_3 in 10 ccm gefunden, was 0,0144 mg N entspricht. Hier zeigte also die kolorimetrische Ablesung überhaupt keine Streuung. Es bedingte aber die Verschiebung der Flüssigkeitsschicht um 0,1 mm, d. h. um 1 Proz. ihrer Höhe eine sehr deutliche Veränderung der Farbtiefe. Der farbenblinde Beobachter findet für dieselbe Lösung im *Wolff*schen Kolorimeter den mittleren Wert von 0,0144 mg N mit einer maximalen Abweichung von ± 1,04 Proz., einer mittleren Abweichung aus acht Bestimmungen von ± 0,6 Proz. Der wahrscheinliche Fehler der Einzelbestimmung ergibt sich hier (bei dem farbenblinden Beobachter) zu ± 0,8 Proz. des Gesamtwertes.

Die maßanalytische Bestimmung derselben Ammoniakmengen mit n/100 H_2SO_4 und Methylrot zeigte größere Abweichungen vom Mittelwert

[1]) Über die Berechnung vgl. *Allen* und *Davisson*, l. c. S. 187—189.

[2]) *W. H. Jansen* äußert sich zur kolorimetrischen Phosphorsäurebestimmung folgendermaßen: „Da die kolorimetrisch erreichten Werte von der subjektiv sehr variablen Farbenerkenntnis des Analytikers abhängig sind usw." Wir sind der Ansicht, daß gute kolorimetrische Methoden, die auf Helligkeitswahrnehmung zurückgehen, von den betonten Faktoren gar nicht so sehr abhängen.

als die kolorimetrische. Die maximale Abweichung beträgt beim farbentüchtigen Beobachter ± 1,25 Proz.

Bei Stickstoffmengen von 0,1 mg in 10 ccm muß schon auf das Zehnfache verdünnt werden, um ohne Trübung die Farbe zu entwickeln; bei der Bestimmung in einem aliquoten Teile wird der Fehler multipliziert; die kolorimetrische Bestimmung verliert von da an, wie *Allen* und *Davisson* mit Recht hervorheben, ihre Vorteile vor der maßanalytischen.

Wir möchten noch in Übereinstimmung mit *Allen* und *Davisson* betonen, daß die Destillation (in unseren Versuchen nach dem Verfahren von *Parnas* und *Heller* im Vakuumapparat ausgeführt) den Fehler der Titration oder der kolorimetrischen Bestimmung nicht vergrößert.

In Konsequenz aus den obigen Erfahrungen haben wir für die Ammoniakbestimmungen im Blute wie früher ausschließlich die kolorimetrische Bestimmungsmethode mit dem *Wolff*schen Kolorimeter beibehalten; der Stickstoff im enteiweißten Blute wurde titriert und kolorimetriert. Es wurde so verfahren, daß 2 ccm Blut nach *Folin* und *Wu* enteiweißt wurden, dann wurden 5 ccm des Filtrats mit Reagens von *Folin*[1]) verbrannt[2]), nach *Parnas* und *Wagner* destilliert und das Ammoniak in 5 ccm einer n/100 Schwefelsäure aufgefangen. Dann wurde unter Zusatz einer so geringen Menge Methylrot (neutral nach *Clark* und *Lubbs*), daß die Lösung alkalisch kaum gelblich erscheint, mit $^1/_{100}$ NaOH titriert, unter genauer Einhaltung des lachsroten Umschlagpunktes. Die titrierte Lösung wurde dann auf 50 ccm verdünnt, mit dem *Nessler*schen Reagens kurz vor der endgültigen Verdünnung die Färbung entwickelt und im *Wolff*schen Kolorimeter gegen eine ähnlich konzentrierte Standardlösung (0,2 mg N) bestimmt, der die gleiche Menge Methylrot und des Reagens zugesetzt worden sind.

Das Ergebnis einiger Versuche über das Verhältnis der Ammoniakbildung zum Stickstoffgehalt des enteiweißten Blutes ist in der Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II.

	t	Das Blut enthält in 100 g								
		in der 1. Stunde			nach 24 Stunden			nach 48 Stunden		
		NH_3-N mg	N*) mg	N**) mg	NH_3-N mg	N*) mg	N**) mg	NH_3-N mg	N*) mg	N**) mg
1. Kaninchen ♂	17°	0,20	40,9	40,9	1,94	41,8	41	2,62	41	40,95
2. „ ♂	17	0,47	37,4	—	—	36,75	—	—	—	—
3 Taube . . .	17	—	83,8	—	—	83	—	4,5	83	83,5
4. Kaninchen ♀ (stillend)	37	—	—	53 sofort	3,64	—	52,9	—	—	—

*) Maßanalytisch. — **) Kolorimetrisch.

[1]) 300 ccm 85 proz. H_3PO_4, 100 ccm H_2SO_4, 50 ccm $CuSO_4$ 6 proz.; mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt.

[2]) Die Veraschung wird mit 1 ccm des Reagens in Kölbchen nach *Kjeldahl* von 50 ccm Inhalt ausgeführt. Wir setzen einige Splitter „*Quarz porös nach Dennstedt*" zur Verhinderung des Stoßens hinzu und erreichen damit, daß Stoßen und Verspritzen *überhaupt nicht vorkommt.*

Es ist aus diesen Daten zu ersehen, daß, wie früher von *Parnas* und *Heller* angegeben wurde, die Ammoniakentwicklung auf Kosten einer der nichtkolloiden Stickstoffverbindungen geschieht, da ihr keine Erhöhung des Stickstoffs im enteiweißten Blute entspricht.

Die Bestimmung des Aminosäurengehalts wurde nach der kolorimetrischen Methode von *O. Folin* ausgeführt. Dieselbe besteht bekanntlich darin, daß in der auf eine bestimmte alkalische Reaktion gebrachten Aminosäurenlösung (p_H etwa 9) durch Naphthochinonsulfosäure eine orangegelbe Färbung entwickelt wird, die dann kolorimetrisch mit einer ähnlich behandelten Standardlösung von Glykokoll verglichen wird.

Es wurde genau nach den Vorschriften von *Folin* gearbeitet; wir haben uns überzeugen können, daß, wie dieser Forscher hervorhebt, kleine Abweichungen von den von ihm ausgearbeiteten Vorschriften zu paradoxen Resultaten führen.

Als Standard diente Glykokoll „*Kahlbaum*“, in dem der Stickstoffgehalt kontrolliert und richtig befunden war. Der Vergleich wurde stets im *Buerker*schen Kolorimeter ausgeführt.

Bekanntlich reagiert das Naphthochinonreagens auch mit Ammoniak unter Entwicklung einer ähnlichen Färbung wie mit den Aminosäuren. *Folin* hatte dies schon festgestellt, aber mit Recht hervorgehoben, daß der dadurch bedingte Fehler bei Aminosäurenbestimmungen im frischen Blute kaum in Frage kommt, da die Ammoniakmenge darin zu gering ist und die große Zahl und Verschiedenheit der Aminosäuren die Reaktion ohnehin nicht streng spezifisch erscheinen läßt. Unsere Aufgabe war jedoch derart, daß der Ammoniakgehalt des Blutes gegenüber dem Aminosäurengehalt nicht vernachlässigt werden konnte; wir hatten etwa 8 mg Aminosäurenstickstoff ohne Ammoniak gegen 6 mg mit 2 mg NH_3-N oder 8 mg mit 2 mg NH_3-N zu unterscheiden. Wir haben später die kolorimetrische Aminosäurenbestimmung und Gegenwart von Ammoniak mit Hilfe des *Buerker*schen Kolorimeters ausführen können; bei den Untersuchungen, über die hier berichtet wird, wählten wir folgendes Verfahren:

Wenn Aminosäuren und Ammoniak in einer Lösung mit dem Naphthochinonreagens reagierten, dann setzt sich die entwickelte Färbung, was Farbenton und Intensität betrifft, additiv aus den Reaktionsprodukten von Ammoniak und Aminosäuren mit dem Chinon zusammen[1]). (Vgl. Anhang.) Wir bestimmen in dem sofort nach der Entnahme enteiweißten Blute den Aminosäurengehalt ohne Ammoniak; nachdem sich die Ammoniakbildung vollzogen hat, wird der Ammoniak-

[1]) Journ. of biol. Chem. **52**, 377, 1922; Laboratory Manual 1922, S. 259ff.; vgl. auch *Feigl* und *Weise*, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. IV, Teil 4, S. 770.

gehalt wieder bestimmt. Wenn er z. B. 2 mg-Proz. beträgt, der Aminosäuren-N 7 mg-Proz., dann werden folgende Standardlösungen hergestellt:

I. 1 ccm Glykokoll (0,075 mg N) + 3 ccm Wasser.
II. 1 „ „ (0,075 „ „) + 2 „ Ammoniak mit 0,02 mg N + 1 ccm Wasser.
III. 0,05 mg Glykokoll-N + 0,02 mg NH_3-N + Wasser zu 4 ccm.

Wenn nun die Naphthochinonreaktion in Blutproben vor und nach der Ammoniakentwicklung erzeugt wird, dann ist folgendes zu erwarten:

1. Falls die Ammoniakentwicklung auf Kosten des Aminosäurenstickstoffs geschieht, dann muß die Schichthöhe in der ammoniakhaltigen Blutflüssigkeit, verglichen mit Standard III, der Schichthöhe der ammoniakfreien, verglichen mit Standard I, gleich sein.

2. Falls das Ammoniak aus Stoffen entsteht, die nicht mit den Aminosäuren zusammen bestimmt werden, und sich in der Farbenentwickelung zu den Aminosäuren addiert, dann müßte die Schichtdicke der ammoniakhaltigen Lösung gegenüber Standard II die gleiche sein wie die Schichtdicke der ammoniakfreien gegen Standard I.

Wir fanden, daß das letztere in der Tat zutrifft.

Versuch vom 13. März.

Kaninchen ♂; arterielles Blut; sofort nach der Entnahme nach *Folin* und *Wu* enteiweißt. Im Filtrat 1 beträgt der Aminosäuren-N-Gehalt 9,5 mg-Proz.

Das Blut wird bei 17° gehalten; nach 19 Stunden beträgt sein Ammoniakgehalt 1,94 mg-Proz.; eine Probe wird wieder enteiweißt; Filtrat 2. Nach 48 Stunden beträgt der Ammoniakgehalt 2,6 mg-Proz. Es wird enteiweißt; Filtrat 3. Die Schichtdicke beträgt bei:

Filtrat	gegen	Standard		Ablesungen
Filtrat 1	gegen 10 mm	Standard I	7,87 mm	(9 Ablesungen)
„ 2	„ 10 „	„ I	7,5 „	(5 „)
„ 2	„ 10 „	„ II	7,8 „	(9 „)
„ 2	„ 10 „	„ III	6,4 „	(6 „)
„ 3	„ 10 „	„ I	7,4 „	(9 „)
„ 3	„ 10 „	„ II	7,7 „	(6 „)
„ 3	„ 10 „	„ III	6,3 „	(6 „)

Es sei noch bemerkt, daß der Farbenton beim Vergleich von 3 und 2 mit II identisch, beim Vergleich mit III sehr verschieden ist.

Versuch vom 23. April.

Kaninchen, ♀ (stillend). Blutentnahme, nach 10 Minuten enteiweißt. Aminosäuren-N: 8,6 mg-Proz. Bei 37° gehalten; nach 3 Stunden NH_4-N-Gehalt: 1,39 mg-Proz; enteiweißt, Filtrat 2. Nach 24 Stunden Ammoniak-N: 3,6 mg-Proz. Enteiweißt, Filtrat 3. Standardlösungen I: 0,075 mg Glykokoll-N; II: 0,075 mg Glykokoll-N + 0,0067 NH_3-N; III: 0,075 mg Glykokoll-N + 0,02 mg NH_3-N.

Filtrat	gegen Standard		Ablesungen
Filtrat 1	gegen Standard I . . .	8,7 mm	(10 Ablesungen)
„ 2	„ „ II . . .	8,9 „	(7 „)
„ 3	„ „ III . . .	8,8 „	(7 „)

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Ammoniakabspaltung im Blute nicht auf Kosten von Aminosäuren geschieht. Der Umstand, daß die Ammoniakentwicklung in den Blutkörperchen erfolgt, in welchen nach den Befunden von *K. Rzetkowski* sowie von *Folin* und *Berglund* die Aminosäuren des Blutes vorwiegend konzentriert sind, hat den Gedanken nahegelegt, daß zwischen dem Aminosäurengehalt und der Ammoniakbildung ein Zusammenhang bestehe; gegen eine Bildung durch Desaminierung der Aminosäuren sprach wieder der anaerobe Charakter der Ammoniakabspaltung. Es mußte aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß oxydierte Zwischenprodukte der Desaminierung in den Blutkörperchen transportiert werden, welche vielleicht bei der Formoltitration, die *Rzetkowski* anwandte, oder der Naphthochinonsulfosäurereaktion der Aminosäuren nach *Folin* und *Berglund* mitbestimmt werden. Diese Vermutung fällt nun fort.

III.

Um direkt zu prüfen, ob eine in Berührung mit den kolloiden Blutbestandteilen ammoniakabspaltende nichtkolloide Substanz im Blute vorhanden sei, wurde folgender Versuch gemacht:

Einem Kaninchen wurden 45 ccm Blut aus der Vena jugularis entnommen und sofort nach *Folin* und *Wu* enteiweißt. Das Filtrat (320 ccm) wurde sofort im Vakuum bei einer Badtemperatur von 38 bis 42^0 eingeengt; das Endvolumen beträgt 30 ccm, die Reaktion wird auf $p_H = 7,4$ gebracht. Das enteiweißte Filtrat hat also annähernd das Volumen des ihm entsprechenden Vollblutes.

Im Destillat, das bei der Einengung gesammelt wurde, befanden sich 0,03 mg Ammoniak-N; das eingeengte Filtrat (F) enthält 0,3 mg-Proz. Ammoniak-N. Es wird mit Toluol aufbewahrt.

A. Im ersten Versuch prüften wir die Ammoniakabspaltbarkeit mittels hämolysierter Blutkörperchen, da wir befürchteten, zu negativem Ergebnis zu gelangen, falls die Blutkörperchen für die ammoniakabspaltende Substanz nicht permeabel sein sollten.

Einem Kaninchen wurde Blut entnommen und Portionen von je 5 ccm zentrifugiert; das Plasma wurde abgehoben und die Körperchen mit destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Blutvolumen unter Hämolyse aufgefüllt; dann wurde zu Probe I: 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung ($p_H = 7,4$), zu Probe II: 5 ccm Filtrat (F) hinzugefügt. Die Kochsalzlösung war mit Toluol gesättigt. Temperatur 17^0.

Nach 16 Stunden enthält:

I . . . . . 0,8 mg-Proz. NH_3-N (auf Vollblut bezogen)
II . . . . . 1,3 mg-Proz. NH_3-N (,, ,, ,,)

Die Proben werden in einen Brutschrank von 37° eingesetzt. Nach weiteren 24 Stunden enthält:

I . . . . 1,41 mg-Proz. NH_3-N (auf Vollblut bezogen)
II . . . . 3,81 mg-Proz. NH_3-N („ „ „)

Mit dem gleichen Volumen von NaCl und von (F) versetzte Plasmaproben zeigen nach 24 Stunden je 1,2 mg-Proz., nach 48 Stunden 1,2 und 1,3 mg-Proz. Ammoniak (auf unverdünntes Plasma bezogen).

B. Es werden folgende Proben angesetzt:

a) 5 ccm Blut zentrifugiert, Plasma abgehoben, mit Wasser auf 5,3 ccm, mit 0,9 NaCl auf 10 ccm aufgefüllt;
b) ebenso, nur statt mit NaCl mit Filtrat (F) auf 10 ccm aufgefüllt;
c) 5 ccm Blut mit 5 ccm Filtrat (F) versetzt;
d) 5 ccm Blut.

NaCl-Lösung und Filtrat mit Toluol gesättigt, alle Proben mit einer Mischung von Paraffin mit Toluol bedeckt.

Versuchstemperatur 37°. Nach 24 Stunden enthält:

a) . . . 1,78 mg-Proz. NH_3-N (auf unverdünntes Blut bezogen)
b) . . . 2,6 „ NH_3-N („ „ „ „)
c) . . . 3,84 „ NH_3-N („ „ „ „)
d) . . . 2,67 „ NH_3-N („ „ „ „)

Nach weiteren 24 Stunden erwies sich Probe c) nicht mehr steril. In den anderen Proben konnten in Ausstrichen[1]) keine Bakterien nachgewiesen werden.

Es enthielten nach 43 Stunden:

a) . . . 1,6 mg-Proz. NH_3-N (auf unverdünntes Blut bezogen)
b) . . . 4,6 „ NH_3-N („ „ „ „)

C. In einer dritten Versuchsreihe wurden NaCl und Filtrat (F) zu genuinem Blute hinzugefügt, da im vorhergehenden Versuch die Permeabilität der Blutkörperchen für die Muttersubstanz des Ammoniaks erwiesen schien. In dieser Versuchsreihe wurde mit allen Kautelen für die Sterilität gesorgt, die Blutproben erwiesen sich auch nach 24 Stunden bei 37° bakterienfrei, auch der weitere Verlauf des Versuchs bewies dies.

Versuchstemperatur 37°, keine Paraffinbedeckung:

Probe a) . . . . 2 ccm Blut + 2 ccm NaCl
„ b) . . . . 2 „ „ + 2 „ Filtrat (F)
„ c) . . . . 2 „ „ + 2 „ „ (F)
„ d) . . . . 2 „ „ + 2 „ „ (F) (gekocht).

[1]) Für die Ausführung der bakteriologischen Kontrollen sind wir Herrn Prof. Dr. *Steusing* zu Dank verpflichtet.

Die NaCl-Lösung und Filtrat (F) sind mit Toluol gesättigt.

Nach 24 Stunden enthält:

Probe				
Probe a	2,04	mg-Proz.	NH_3-N	(auf unverdünntes Blut berechnet)
„ b	2,85	„	NH_3-N	(„ „ „ „)
„ c	2,91	„	NH_3-N	(„ „ „ „)
„ d	2,91	„	NH_3-N	(„ „ „ „)

Nach 47 Stunden enthält:

Probe				
Probe a	2,08	mg-Proz.	NH_3-N	(auf unverdünntes Blut berechnet)
„ b	3,16	„	NH_3-N	(„ „ „ „)
„ c	3,16	„	NH_3-N	(„ „ „ „)
„ d	3,12	„	NH_3-N	(„ „ „ „)

In dem aufbewahrten Filtrat (F) blieb der Ammoniakgehalt unverändert 0,3 mg-Proz., durch kurzes Kochen stieg er auf 0,45 mg-Proz. Es wurde folglich in den Versuchen, in welchen Filtrat (F) zugesetzt wurde, 0,15 mg-Proz. bzw. in Versuch C, d) 0,22 mg-Proz. präformiertes Ammoniak hinzugefügt.

Der Verlauf dieser Versuche, besonders der des ganz klaren Versuchs C (vgl. Abb. 1) zeigt aufs deutlichste, *daß im enteiweißten Blute eine Substanz vorhanden ist, welche im Blute Ammoniak abspaltet.*

Abb. 1.
Ordinaten: mg NH_3—N in 100 ccm unverdünntem Blut. Abszissen: Zeit. A: Blut mit 0,9 Proz. NaCl; B: dasselbe mit Filtrat F. Vgl. Versuch C.

Zusammenfassung.

Es wird nachgewiesen, daß die Ammoniakabspaltung im Blute nicht auf Kosten der kolloiden Bestandteile erfolgt.

Es wird nachgewiesen, daß der Stickstoff der Aminosäuren nicht die Quelle des im Blute entstehenden Ammoniaks ist.

Es wird nachgewiesen, daß im enteiweißten Blute eine Substanz vorhanden ist, welche vom Blute zu Ammoniak zersetzt wird.

Es werden die Fehlergrenzen der kolorimetrischen Bestimmung kleiner Ammoniakmengen erörtert und ein Weg zur kolorimetrischen Bestimmung von Aminosäuren in Gegenwart von Ammoniak angegeben.

Anhang.

Über die kolorimetrische Bestimmung der Aminosäuren in Gegenwart von Ammoniak.

Es wurden die Schwierigkeiten der Bestimmung von Aminosäuren in Gegenwart von Ammoniak erwähnt und ein Weg beschrieben, um unter Anwendung einer Reihe von Standardlösungen den Aminosäure-N-Gehalt zu ermitteln. Es gelingt indessen, den Aminosäuren-N nach dem *Folin*schen kolorimetrischen Verfahren in kleinen Blutmengen zu bestimmen, wenn man das neue Kolorimeter nach *Buerker* der Firma Leitz[1]) verwendet und von seinen besonderen Einrichtungen Nutzen zieht.

Wir haben dieses ausgezeichnete Instrument zu verschiedenen kolorimetrischen Arbeiten verwendet und finden, daß es mit seiner bequemen und praktischen Konstruktion, der ausgezeichneten Optik und dem Grundprinzip der symmetrischen Strahlenführung das höchste Lob verdient. Es ist bis in das kleinste Detail überaus praktisch durchkonstruiert und erlaubt ein schnelles Arbeiten, wenn man eine entsprechende Zahl der Trögchen für Standardlösungen verwendet.

Es wird bekanntlich von den Erzeugern hauptsächlich für Blutfarbstoffmessungen ausgestattet und empfohlen. Wir finden es für alle kolorimetrischen Arbeiten des biochemischen Laboratoriums den besten Instrumenten gleichwertig oder überlegen. Nur bei äußerst farbschwachen Lösungen, wie z. B. bei der Bestimmung von Ammoniak in Mengen der Größenordnung von 0,001 mg NH_3-N in 10 ccm, versagt es; solche Mengen sind auch in den anderen Präzisionskolorimetern nicht bestimmbar, und nur die *Hehner*schen Mensuren, bzw. das *Wolff*sche Kolorimeter, sind für solche Bestimmungen verwendbar.

Wenn man vor der Aminosäurenbestimmung nach *Folin* das störende Ammoniak durch einen Luftstrom vertreiben will, so ändert man dadurch den Salzgehalt und die Alkalinität der Lösung, und man erhält dann paradoxe Resultate für den Aminosäurenstickstoff. Wir versuchten nun folgendes Verfahren: man bestimmt den Ammoniakgehalt der Aminosäurenlösung[2]) und stellt dann eine solche Standardlösung der Aminosäuren her, welche außer den Aminosäuren die gleiche Ammoniakmenge enthält wie die untersuchte; dann eine zweite, mit dem gleichen Ammoniakgehalt, aber ohne Aminosäuren. In der untersuchten Lösung, dem Aminosäuren-Ammoniakstandard und in dem

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem., Jahrg. 36, S. 427, 1923; Arch. f. d. ges. Physiol. **208**, 1924.

[2]) Nach dem gewöhnlichen Verfahren durch Übertreibung im Luftstrom in der enteiweißten Blutflüssigkeit oder nach *Parnas* und *Heller* (l. c.).

Ammoniakstandard erzeugt man dann die Färbung. Die Flüssigkeiten werden folgendermaßen im Kolorimeter verteilt: Konstante 10 mm-Schicht: Variable Schicht (rechts und links gleich hoch); rechts Aminosäuren-Ammoniakstandard, Ammoniakstandard; links: Ammoniakstandard, untersuchte Lösung.

Bei dieser Anordnung wird also von beiden Seiten die gleiche Menge der durch Ammoniak verursachten Färbung wirken, und die durch Aminosäuren verursachte Färbung ist direkt meßbar.

Der additive Charakter der beiden Farbkomponenten und die kolorimetrische Meßbarkeit der Aminosäuren ergibt sich aus folgenden Versuchen:

Standard I: 1 ccm Glykokoll mit 0,075 g N + 3 ccm Ammoniak mit je 0,002 mg N + 5 ccm H_2O.
Standard II: 3 ccm Ammoniak wie in I + 6 ccm Wasser.
Standard III: 0,5 ccm Glykokoll wie in I + 3 ccm Ammoniak wie in I + 5,5 ccm Wasser.
Standard IV: 2 ccm Glykokoll wie in I + 3 ccm Ammoniak wie in I + 4 ccm Wasser.

Naphthochinonsulfosäurereaktion nach *Folin*, alle Proben zu 35 ccm verdünnt. Im Kolorimeter:

	Rechts	Links
10 mm-Schicht	I	II
Variable Schicht . . .	II	I bzw. II bzw. III

Wenn II mit I verglichen wird, so wird bei völlig gleichem Farbenton genau 10 mm abgelesen; wird III gegen I verglichen, so wird genau 20 mm abgelesen; IV gegen I ergibt genau 5 mm. Die Farbtöne sind immer genau gleich.

Wahrscheinlich werden kolorimetrische Aufgaben von dem Typus der hier beschriebenen auch in anderen Fällen mittels des *Buerker*schen Kolorimeters zu lösen sein.

Die Flockung des kolloidalen Goldes durch Eiweißkörper.

Von

Hans Adolf Krebs.

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. April 1925.)

Die vorliegenden Untersuchungen gingen aus der Beschäftigung mit der Goldsolreaktion im Liquor cerebrospinalis hervor. Sie stellen einen Beitrag dar zur physikalisch-chemichen Analyse der Flockungsreaktionen zwischen kolloidalem Gold und Eiweißkörpern. Über diese spezielle Frage hinaus sind die Ergebnisse von Interesse auch für einige allgemein physiko-chemische Probleme, insbesondere für das Phänomen der „unregelmäßigen Reihen". Weiterhin sind sie wesentlich für das theoretische Verständnis der „Goldsolreaktion" und der anderen sogenannten „Kolloidreaktionen" im Liquor cerebrospinalis.

Bisher haben sich mit den hier zu erörternden Erscheinungen besonders *Zsigmondy* (1 bis 4) und seine Schüler befaßt. Ferner sind diese Fragen im Zusammenhang mit der Goldsolreaktion in einer Reihe von Arbeiten studiert worden. Wir möchten aber aus Zweckmäßigkeitsgründen auf diese Untersuchungen — obgleich sie natürlich sehr wichtig sind — nicht *vor* unseren eigenen experimentellen Befunden, sondern erst im Zusammenhang mit diesen zu sprechen kommen.

Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen waren einige mehr oder weniger Zufallsbeobachtungen gelegentlich der Ausführung der Goldsolreaktion. Die eine davon war die Feststellung, daß die Fällung des Goldes durch Eiweiß in hohem Grade von der H-Ionenkonzentration des Mediums abhängig ist (was übrigens schon früheren Autoren bekannt war). Dies gab den Anlaß dazu, die Bedeutung der H-Ionenkonzentration *systematisch* zu verfolgen. Eine zweite war die Auffindung einer neuen Methode der Goldsolherstellung. Über dieses bereits kurz veröffentlichte Verfahren (5) habe ich inzwischen einige neue eigenartige Erfahrungen gemacht, die ich hier vor der Behandlung des eigentlichen Themas zunächst mitteilen möchte.

Zur Herstellung der Goldsole.

Das Verfahren besteht in folgendem: 200 ccm doppeltdestillierten Wassers werden im Jenaer Becherglas mit 1 ccm 5proz. Traubenzuckerlösung (oder 3proz. Formalinlösung) und 2 bis 6 ccm 1proz. Pottaschelösung erhitzt. Beim Sieden fügt man langsam tropfenweise 3 ccm einer 1proz. Goldchloridlösung hinzu. Die einfallenden Tropfen werden nach wenigen Sekunden zu einem klaren rubinroten Goldsol reduziert.

Das Eigenartige an dieser Methode ist der Umstand, daß man bei ihr die Pottaschemenge innerhalb erheblicher Grenzen variieren darf, daß also die Darstellungsmöglichkeit rubinroter Sole weitgehend unabhängig von der Reaktion des Mediums ist; nimmt doch mit jedem Tropfen Goldchlorid die Alkaleszenz ab. Bei den allermeisten bisherigen Methoden, soweit ich sie übersehe, wird gerade die Bedeutung der *neutralen* Reaktion im Moment der Reduktion des Goldchlorids immer wieder betont.

Ferner gelingt es, nach diesem Verfahren sehr *konzentrierte* Goldsole herzustellen, indem man z. B. 200 ccm Wasser mit 2 ccm Pottasche (1 proz.) und 1 ccm 5proz. Traubenzuckerlösung erhitzt, 2 ccm des Goldchlorids dann hinzufügt und nach der Reduktion erneut 2 ccm Pottaschelösung und 1 ccm Traubenzucker zugibt, danach wiederum 2 ccm Goldchlorid eintropfen läßt und diese Prozedur mehrmals wiederholt. So lassen sich leicht tiefrubin- bis purpurrote Goldsole herstellen, deren Gehalt an Gold im Liter 0,6 g Goldchlorid (Aurum chloratum crystallisatum flavum *Merck*) entspricht.

Eigentümlich ist weiter an dem Verfahren noch, daß häufig die Farbe des Goldsols nach dem Eintropfen des Goldchlorids zunächst dunkelblaurot ist, sich aber nach einigen Sekunden oder Minuten spontan zu reinem Rubinrot (ohne jeden bläulichen Farbton) aufhellt. Die Goldsole mit wenig Pottaschegehalt reagieren sauer gegen Lackmus und sind sehr empfindlich für die Flockung durch Elektrolyte und Eiweißkörper. Mit zunehmender Pottaschemenge nimmt die Koagulierbarkeit ab.

Nach meiner Vorschrift stellte ich über ein halbes Jahr lang Goldsole zu liquordiagnostischen und Versuchszwecken her, bis sie eines Tages plötzlich versagte. Ohne daß ich mir einer Änderung in der Technik bewußt gewesen wäre, wurden die Goldsole stets trübe und blau. Außerdem trat die Reduktion sehr verzögert auf. Erst nach wochenlangem Bemühen ist es mir gelungen, des Rätsels Lösung zu finden. Es stellte sich heraus, daß mein Verfahren nur dann gelingt, wenn in meiner Destillationsanlage, in der das doppeltdestillierte Wasser hergestellt wurde, das Verbindungsrohr zwischen Destillierkolben und Liebigkühler mit *Gummi*stopfen eingefügt war. Ich hatte zu jenem Zeitpunkt, als die Methode plötzlich mißlang, jene durch *Kork* ersetzt, wie mir nachträglich in Erinnerung kam. Durch die Gummistopfen gelangen in das doppeltdestillierte Wasser Verunreinigungen, an deren Gegenwart das Gelingen meines Verfahrens gebunden ist. Ich kann über die Natur dieser Verunreinigungen nichts Genaueres aussagen. Daß sie wirklich existieren, geht wohl daraus hervor, daß das Experiment des Korkwechsels wiederholt immer zu dem gleichen Resultat führte. Ferner weist auch das Gummiwasser stets einen schwachen eigenartigen Geruch nach Gummi oder Kautschuk auf und ist in dickerer Schicht etwas opaleszent. Letzteres deutet vielleicht auf die kolloide Natur der fraglichen Substanzen hin. Das Korkwasser ist dagegen absolut klar und geruchlos.

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Goldsole stets nach obigem Verfahren hergestellt.

Die Fällung von Goldsolen verschiedener Acidität durch Blutserum.

Die erste Versuchsreihe betrifft die Flockung von Goldsolen verschiedener Acidität durch Blutserum. Wie bereits oben erwähnt, veranlaßten mich zu diesen Experimenten Beobachtungen über die Bedeutung der Goldsolacidität bei der Goldsolreaktion im Liquor, über die ich an anderer Stelle bereits berichtet habe (5).

Die Versuchsanordnung war der Goldsolreaktion im Liquor nachgebildet. Gleiche Mengen Goldsol wurden zusammengebracht mit in geometrischer Reihe abnehmenden Serummengen (24 Reagenzgläser) in der Weise, daß zuerst in Glas 2 bis 24 je 0,5 ccm destilliertes Wasser hineinpipettiert wurden; in das erste und zweite Röhrchen kamen je 0,5 ccm Blutserum (von einem Aderlaß bei einem Urämiekranken herrührend). Dann wurden aus dem zweiten Glase 0,5 ccm ins dritte pipettiert, mit dem Wasser vermischt, dann 0,5 ccm aus dem dritten in das vierte hinüberpipettiert usw. Es resultiert eine Reihe, in der die Serumkonzentration in geometrischer Progression mit dem Quotienten $1/2$ abnimmt ($1, 1/2, 1/4$ ... 1: 8,3 Millionen). In jedem Röhrchen befindet sich $1/2$ ccm der Serumverdünnung. Dazu kommen je 2,5 ccm Goldsol. Es wurden sechs Goldsole verschiedener Acidität verwendet. Zur Charakterisierung der Acidität muß ich mich auf die Angabe des Pottaschegehaltes beschränken, da mir eine Gaskette zur Messung des p_H in unserem klinischen Laboratorium nicht zur Verfügung stand, und da die Titration der Goldsole zu ungenaue Werte ergibt. Es enthielt:

Goldsol 1	 2	ccm Pottasche
„ 2	 2,4	„ „
„ 3	 2,8	„ „
„ 4	 3,2	„ „
„ 5	 3,6	„ „
„ 6	 4,0	„ „

auf je 200 ccm Wasser, 3 ccm 1 proz. Goldchlorids, 1 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt.

Es ergeben sich aus diesen Versuchen zunächst folgende Tatsachen.

1. Nur stärker saure Goldsole (wenig Pottaschegehalt) werden durch Blutserum geflockt, nicht dagegen alkalische (was übrigens nicht neuartig ist, *Zsigmondy* u. a.).

2. Bei höherer Acidität des Goldsols (Goldsol 1 des Versuchs) treten (in der gewählten Versuchsanordnung) *zwei* Ausflockungszonen auf. Zone 1 liegt im Gebiet der höchsten Serumkonzentration, Zone 2 bei sehr geringer. Beide zeigen ein ganz *verschiedenes* Bild. Hier bedarf die folgende Tabelle noch einiger ergänzender Bemerkungen über Versuchsbeobachtungen, die sich tabellarisch nicht einfügen ließen.

Tabelle I. Flockung von Goldsolen verschiedener Acidität (vgl. Text) durch Blutserum.

Glas Nr.	Serum-konzentration	Goldsol 1		Goldsol 2		Goldsol 3		Goldsol 4		Goldsol 5		Goldsol 6
		nach 1 Min.	nach 24 Std.	nach 1 Min.	nach 24 Std.	nach 1 Min.	nach 24 Std.	nach 1 Min.	nach 24 Std.	nach 1 Min.	nach 24 Std.	n. 1 Min. *und* nach 24 Std.
1	1	ger. Tr., F. unv.	reichl. blr. Bod., F. unv.	unv.	reichl. blr., Bod., Lösung rosa	unv.	r. Bod., Op., rosa	Sp., Op., Farbe unv.	wenig r. Bod., r.	minim. Op., F. unv.	ger. Op., F. unv.	minim. Op., F. unv.
2	1 : 2	Tr., F. unv.	ebenso	Op., F. unv.	ebenso	Op., F. unv.	r. Bod., Op., blaßrosa	ebenso	violettroter Bod., rosa	ebenso	ebenso	ebenso
3	1 : 4	st. Tr. F. unv.	blr. reichl. Bod., überst. Flüssigk. wasserhell	ebenso	blr. Bod., wasserhell	Tr., Sp. blr.	blr. Bod., Op., ungef.	klar, Farbe unv.	ebenso	„	„	unv.
4	1 : 8	sehr st. Tr., F. unv.	ebenso	st. Tr., blr.	ebenso	Tr., blr.	blr. Bod., wasserhell	ebenso	blr. Bod., wasserhell	klar, F. unv.	Op., F. unv.	„
5	1 : 16	ebenso	„	„	„	st. Tr., blr.	ebenso	„	ebenso	ebenso	blr. Bod., wasserhell	„
6	1 : 32	unv.	Tr., v.	Tr., blr.	v. Bod., wasserhell	ebenso	v. Bod., wasserhell	„	„	„	ebenso	„
7	1 : 64	„	unv.	klar, blr.	ebenso	Tr., blr.	ebenso	Tr., blr.	bl. Bod., wasserhell	Op., blr.	v. Bod., wasserhell	„
8	1 : 128	„	„	ebenso	bl. Bod., wasserhell	klar, blr.	Op., v.	ebenso	ebenso	ebenso	ebenso	„
9	1 : 256	„	„	unv.	unv.	klar, Sp. blr.	klar, blr.	„	„	„	bl. Bod., wasserhell	„
10	1 : 512	„	„	„	v.	ebenso	v.	„	bl. Bod., hell rotblau	klar, F. unv.	ebenso	„
11	1 : 1024	„	„	Spur blr.	„	blr.	blauviolett	klar, blr.	ebenso	ebenso		„
12	1 : 2048	„	„	ebenso	„	„	bl.	ebenso	wen. bl. Bod., wasserhell	„	„	„
13	1 : 4096	„	blr.	blr.	blauviolett	v.	„	„	ebenso	„	„	„
14	1 : 8192	blr.	v.	v.	bl.	blauviolett	bl. Bod., wasserhell	„	„	„	„	„
15	1 : 16384	v.	bl.	bl.	bl. Bod., wasserhell	bl.	ebenso	„	v.	„	„	„
16	1 : 32768	bl.	bl. Bod., wasserhell	„	ebenso	„	„	unv.	blr.	„	„	„
17	1 : 65536	„	bl. Bod., schw. hellbl.	blauviolett	bl. Bod., hellblau	blr.	v.	„	unv.	„	v.	„
18	1 : 131072	v.	v.	v.	v.	„	blr.	„	„	„	unv.	„
19	1 : 262144	blr.	blr.	blr.	blr.	unv.	Spur, blr.	„	„	„	„	„
20	1 : 524288	r., unv.	„	unv.	„	„	unv.	„	„	„	„	„
21	1 : 1048576	„	r., unv.	„	unv.	„	„	„	„	„	„	„
22–24	1 : 2097152 – 1 : 8388608	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„

Abkürzungen der Tabelle: Op. = Opaleszenz, Tr. = Trübung, Bod. = Bodensatz, st. = stark, ger. = gering, F. = Farbe, r. = rot, blr. = blaurot, v. = violett, bl. = blau, unv. = unverändert.

In Zone 1 beobachtet man im Beginn der Flockung zunächst eine Opaleszenz, die bald zu einer Trübung zunimmt. Die Trübung wird immer massiger, ohne daß sich die rote Farbe der Lösung merklich änderte. Im Verlauf einiger Stunden setzt sich in der Reagenzglaskuppe ein reichlicher rot oder rotviolett gefärbter Niederschlag ab. Die darüberstehende Schicht ist im durchfallenden Licht entweder wasserklar oder, bei unvollkommener Flockung, rosa gefärbt; bei auffallender Beleuchtung opalesziert sie zuweilen eine Spur. Der Bodensatz läßt sich leicht zu einer trüben schmutzig roten oder blauroten Suspension aufschütteln. Gibt man zu dieser Aufschwemmung geringe Mengen Alkali, z. B. 1 Tropfen n/10 NaOH, so erhält man sofort eine klare, rubinrote, vollkommen stabile Lösung (Peptisation). Genau dasselbe läßt sich mit Säure (1 Tropfen n/10 HCl) erzielen, ebenso mit Neutralsalz in größerer Menge (z. B. 0,5 ccm n NaCl). Die Flockung ist also vollständig reversibel, auch eine Verfärbung des Goldes zu violett geht zu rubinrot zurück.

Die überstehende Flüssigkeit gibt bei Halbsättigung mit Ammonsulfat eine schwache Trübung. 10proz. Sulfosalicylsäure oder 33proz. Trichloressigsäure bewirkt sehr starke Fällung. Die Lösung enthält also noch Eiweißkörper, und zwar, wie aus dem Mißverhältnis der Stärke der Ammonsulfat- und Sulfosalicylsäure- bzw. Trichloressigsäurefällung hervorgeht, offenbar mehr Albumine als Globuline.

Ganz im Gegensatz zu diesen Eigentümlichkeiten der Zone 1 steht in der zweiten Zone die bekannte Farbveränderung des Goldes von rot über violett, blau, hellblau und das Absetzen der blauen Partikel zu einem spärlichen Niederschlag ganz im Vordergrund der Erscheinung. Bei der Verfärbung ist im auffallenden Licht zwar auch eine geringe Opaleszenz zu beobachten. Eine einmal erfolgte *totale* Flockung ist vollkommen irreversibel. Der Bodensatz läßt sich nur zu einer groben, blaßblauen Suspension aufschütteln, ist aber durch keine der obigen Reagenzien peptisierbar. Eine *unvollkommene* Flockung (Verfärbung nur bis zu violett oder blau, z. B. Glas 15, Goldsol 1) geht allerdings bei Zusatz von NaOH manchmal eine Spur zurück. Der Farbton nähert sich etwas dem ursprünglichen Rot.

Die beiden Zonen zeigen ferner ein verschiedenes Verhalten bei Änderung der Goldsolacidität. Zone 1 wird breiter und rückt in das Gebiet geringerer Serumkonzentration. Dabei tritt, je weiter diese Verschiebung geht, neben der Trübung eine Veränderung der Farbe in Erscheinung (Blaufärbung). Zone 2 dagegen rückt umgekehrt ein wenig in das Gebiet höherer Serumkonzentrationen. Mit weiterer Zunahme der Alkaleszenz (Goldsol 4) vereinigen sich, namentlich durch Verschiebung der ersten Zone, beide Zonen zu einem gemeinsamen breiten Flockungsbereich, innerhalb dessen die beiden oben ausein-

andergehaltenen Flockungsformen fließend ineinander übergehen. Trübung + Farbveränderung treten gleichzeitig auf. Die Reversibilität durch Säure, Alkali, und Neutralsalzzusatz nimmt ab, je geringer die Serumkonzentration ist. Sie wird zuerst unvollkommen, schließlich gleich Null.

In diesem Flockungsgebiet (z. B. bei Goldsol 4) kann man sehr schön die von *Zsigmondy* (2) zuerst am Caseingold beschriebenen Indikatorreaktionen des Goldes beobachten. Die Blaufärbung des Goldes ist durch Zugabe von Alkali prompt in reines Rubinrot zurückzuverwandeln. Unter günstigen Bedingungen kann man das gleiche auch durch Säure erreichen. Nicht so prompt ist der Umschlag zurück zum Blau, wenn man die Alkali- bzw. Säurewirkung durch eine äquivalente Säure- bzw. Alkalimenge aufhebt. Es dauert dann gewöhnlich mindestens einige Minuten, bis die reine blaue Farbe wieder erreicht ist.

Die Flockung des kolloidalen Goldes durch Casein und Gelatine.

In entsprechender Versuchsanordnung wie in den vorhergehenden Versuchen wurde die Fällung des Goldes durch einige reine Eiweißkörper untersucht. Beim Casein waren die Resultate denen beim Blutserum vollkommen analog. Es traten ebenfalls die zwei Flockungszonen mit den beschriebenen Eigentümlichkeiten auf. Ich benutzte Casein (*Kahlbaum*) in 2proz. Lösung in 0,05 n NaOH, von der ausgehend die Verdünnungen hergestellt wurden. Auf eine genauere Wiedergabe der Protokolle glaube ich verzichten zu können, da die Versuche prinzipiell mit den mitgeteilten Blutserumuntersuchungen vollkommen übereinstimmten.

Dagegen tritt bei Verwendung von Gelatine [5proz. Gelatine des Handels mit Natronlauge neutralisert (p_H 7,0) als Ausgangslösung] nur die zweite Flockungszone auf. Sie liegt bei etwa gleicher Eiweißkonzentration wie beim Serum und Casein (entsprechend der Feststellung *Zsigmondys*, daß die „Umschlagszahlen“ der verschiedenen Eiweißkörper von gleicher Größenordnung sind).

Die beiden verschiedenen Flockungstypen bei der Fällung des Goldes durch Eiweißstoffe sind, soweit ich sehe, bisher noch nicht in dieser Weise beschrieben worden. Doch kennt man, worauf hier nur kurz verwiesen sei, Analoga zu den beiden Flockungstypen bei der Flockung des Goldes durch *andere* Kolloide. So entspricht die Zone 1 den Beobachtungen bei der Flockung des Goldes durch kolloidale Metallhydroxyde, z. B. durch Zinnsäure (*Cassius*scher Purpur), durch Tonerdegel usw., Zone 2 den Erscheinungen der „Umschlagszahlen“ [*Zsigmondy*, *Gann* (3)].

Die Theorie der Flockung des Goldes durch Eiweißkörper.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß es sich bei den zwei Zonen, wie sie am reinsten bei Goldsol 1 zu beobachten waren, um zwei verschiedenartige Vorgänge handeln muß. Das ergibt sich aus der

differenten Erscheinungsweise der Flockungen (einmal mit der Trübung, das andere Mal mit der Farbveränderung im Vordergrund) für denjenigen, der diese Versuche *gesehen* hat, vielleicht noch selbstverständlicher, als es nach der bloßen Beschreibung in den vorhergehenden Seiten erscheinen mag.

Beschäftigen wir uns zunächst mit Zone 1. Die hier hervortretende Trübung und grobe Fällung legt den Gedanken nahe, daß es sich hier in erster Linie um die Ausflockung eines Eiweißkörpers handelt. In der Tat zeigten die daraufhin angestellten Versuche und Überlegungen, daß dies zutrifft, und wir kamen schließlich — um das Ergebnis vorwegzunehmen — zu der Überzeugung, daß das Wesentliche bei den Flockungsvorgängen der Zone 1 die Ausfällung der Globuline in ihrem isoelektrischen p_H-Bereich ist. Das kolloidale Gold ist, wie wir nach *Zsigmondy* annehmen müssen, adsorptiv an die Eiweißkörper gebunden und macht infolgedessen die Reaktionen des Eiweißes mit, wird also bei der Fällung des Globulins mit niedergerissen (darüber später ausführlicher).

Zu dieser Auffassung führten uns folgende Versuche und Erwägungen. Wenn Zone 1 durch eine Fällung des Globulins im isoelektrischen Punkte mitbedingt wäre, so hieße das, daß wir in dem sauren Goldsol als wesentlichstes für die Flockung die *Säure*, nicht die Goldmizellen betrachten. Infolgedessen müßte man eine der ersten Zone entsprechende Flockung beobachten, wenn man in unserer Versuchsanordnung zur Fällung des Serums an Stelle des sauren Goldsols eine verdünnte Säure nimmt. Dies ist auch nach der folgenden Versuchsreihe wirklich der Fall.

Es wurden Serumverdünnungen in gleicher Weise wie im ersten Versuch hergestellt, so daß zehn Röhrchen mit je 0,5 ccm Serumverdünnung erhalten wurden. Jedem wurden (entsprechend dem Goldsol im früheren Versuch) 2,5 ccm Salzsäure verschiedener Konzentration zugesetzt (HCl-Konzentration in Versuch a n/500, in Versuch b n/2000, in Versuch c n/8000). Die Ergebnisse sind in den Tabellen II bis IV zusammengestellt.

Bei diesen Salzsäurefällungsversuchen sind die Beobachtungen ganz analog denen bei der Flockung durch saure Goldsole. Die Fällung der absteigenden Serummengen mit HCl erreicht ihr Maximum nicht immer bei der stärksten Serumkonzentration, sondern, je geringer die Konzentration der benutzten HCl ist, bei desto stärkerer Serumverdünnung liegt das Maximum. Außerdem ist die Fällungszone im ganzen bei geringerer HCl-Konzentration breiter als bei höherer. Dieses Verhalten erklärt sich ungezwungen, wenn wir annehmen, daß die Ausflockung durch die Unlöslichkeit der Globuline im isoelektrischen Punkt bedingt ist. Bekanntlich ist die Reaktion des Serums schwach alkalisch. Bei der Vermengung von absteigenden Serummengen mit HCl oder sauren Goldsolen muß die Acidität mit abnehmender Serumkonzentration natürlich zunehmen, indem der neutralisierende Einfluß des alkalischen Serums auf die Säure immer geringer wird. Diese Zunahme erfolgt naturgemäß um so langsamer,

Tabelle II.
Flockung von Blutserum durch n/500 H Cl.

Glas Nr.	Serumverdünnung	Ablesung nach 1 Minute	Ablesung nach 2 Stunden	Ablesung nach 24 Stunden
1	1	Trübung	grobe Flocken, sich absetzend	Opaleszenz, grobflockiger Bodensatz
2	1 : 2	starke Trübung	grobe Flocken, Bodensatz	ebenso
3	1 : 4	ebenso	ebenso	„
4	1 : 8	minimale Opaleszenz	minimale Opaleszenz	minimale Opaleszenz
5	1 : 16	klar	klar	klar
6—10	1 : 32 bis 1 : 512	„	„	„

Tabelle III.
Flockung von Blutserum durch n/2000 H Cl.

Glas Nr.	Serumverdünnung	Ablesung nach 1 Minute	Ablesung nach 2 Stunden	Ablesung nach 24 Stunden
1	1	Opaleszenz	Trübung	Opaleszenz, etwas flockiger Bodensatz
2	1 : 2	starke Opaleszenz	starke Trübung	Opaleszenz, reichlicher Bodensatz
3	1 : 4	Trübung	sehr starke Trübung, feinste suspendierte Flocken	ebenso
4	1 : 8	starke Trübung	Suspension grober Flocken, etwas Bodensatz	Opaleszenz, sehr reichlicher Bodensatz
5	1 : 16	ebenso	ebenso	ebenso
6	1 : 32	minimale Opaleszenz	minimale Opaleszenz	Opaleszenz
7	1 : 64	klar	klar	klar
8—10	1 : 128 bis 1 : 512	„	„	„

Tabelle IV.
Flockung von Blutserum durch n/8000 H Cl.

Glas Nr.	Serumverdünnung	Ablesung nach 1 Minute	Ablesung nach 2 Stunden	Ablesung nach 24 Stunden
1	1	Opaleszenz	Opaleszenz	Opaleszenz
2	1 : 2	„	Trübung	starke Trübung
3	1 : 4	„	„	„
4	1 : 8	„	„	„
5	1 : 16	Trübung	„	„
6	1 : 32	starke Trübung	starke Trübung	sehr starke Trübung
7	1 : 64	ebenso	ebenso	ebenso
8	1 : 128	Opaleszenz	Trübung	Trübung
9	1 : 256	klar	klar	Opaleszenz
10	1 : 512	„	„	klar

je verdünnter die Säure ist. Die Unlöslichkeit des Globulins ist auf eine bestimmte Zone um den isoelektrischen Punkt herum beschränkt; sowohl bei geringerer als auch bei höherer *h* ist das Globulin wieder löslich. Die genaueren Angaben über die *h* des Flockungsmaximums des Serumglobulins lauten sehr verschieden. *Rona* und *Michaelis* (6) fanden p_H 5,4, *Ruppel, Ornstein, Carl* und *Lasch* (7) p_H 6,4, *Samson* (8) p_H 7,0. Die Lage der Zone scheint vom *Gesamtelektrolyt*gehalt des Mediums abhängig zu sein [*Michaelis* und *Rona* (9), *Samson* (8)]. Jedenfalls muß bei bestimmten Mengenverhältnissen in dem Serum-Säuregemisch das p_H der isoelektrischen Zone resultieren. Hier fallen die Globuline, falls sie nur in genügender Konzentration vorhanden sind, aus. Aus der Tatsache, daß bei Verwendung *verdünnterer* Säuren das p_H langsamer als bei *stärkerer* abnimmt, ergibt sich sowohl die Verschiebung als auch das Breiterwerden der Flockungszone bei Benutzung verdünnterer Säure als selbstverständliche Konsequenz. Elektrometrische Bestimmungen des p_H konnte ich aus dem erwähnten Grunde leider nicht durchführen.

Die Säureflockung des Blutserums ist in Übereinstimmung mit der Fällung durch saure Goldsole in der Zone 1 reversibel bei Alkali-, Säure- oder Neutralsalzzusatz. Es ist dieses ja ein allgemeines Charakteristikum des isoelektrischen Eiweißes.

Es fragt sich, wenn wir unsere Versuche über die Salzsäurefällung des Serums in Beziehung bringen zu der Flockung durch saure Goldsole, ob nicht die adsorptive Bindung des Goldes an das Eiweiß die Eigenschaften des letzteren, speziell die isoelektrische Reaktionsweise, verändert. Es ist hierzu zu sagen, daß die Eigenschaften derartiger Adsorptionsverbindungen Gold—Eiweiß (hydrophobes-hydrophiles Kolloid) im allgemeinen mit denen des Eiweißes, des hydrophilen Kolloids, identisch sind. Das Gold verliert durch die Vereinigung mit dem Eiweiß seine charakteristischen Reaktionen, z. B. die Elektrolytempfindlichkeit (= Schutzwirkung des Eiweißes), macht hingegen nunmehr alle charakteristischen Reaktionen des Eiweißes mit. Ist dieses an sich durch bestimmte Reagenzien unfällbar, so wird auch das Gold unfällbar; ist es dagegen durch andere fällbar, so fällt auch das Gold gemeinsam mit dem Eiweiß [nach *Zsigmondy* (1), S. 361]. Der Eiweiß-Goldkomplex besitzt demnach im großen und ganzen die gleichen Eigenschaften wie das Eiweiß allein.

Wir kommen somit zu der Auffassung, daß die Flockung der Zone 1 ein Ausfallen des Eiweiß- (wahrscheinlich Globulin-)Goldkomplexes in seinem isoelektrischen p_H-Bereich darstellt.

So erklärt es sich auch, daß bei der Gelatine die Zone 1 nicht auftritt, weil nämlich Gelatine im isoelektrischen Punkte löslich ist (womit von vornherein allerdings nicht gesagt ist, daß der *Gelatine-Goldkomplex* im isoelektrischen Punkte löslich sein *muß*).

Bemerkenswert scheint uns die Tatsache, daß im Globulin-Albumingemisch, wie es das Serum ist, das Gold offenbar in erster Linie (allein ?)

mit dem Globulin, nicht mit dem Albumin in Verbindung tritt. Wir schließen dies aus der oben erwähnten Beobachtung, daß bei vollständiger Flockung des Goldes die überstehende wasserhelle Flüssigkeit nur Spuren Globulin, dagegen reichlich Albumin zu enthalten scheint. Wir möchten dies in Zusammenhang bringen mit den Angaben von *Heubner* und *Jacobs* (10) und *Reitstötter* (11) über die Schutzwirkung des Serumalbumins und -globulins. Ersteres schützt, wie diese Autoren fanden, schlechter als letzteres. Da die Schutzwirkung nach *Zsigmondy* auch auf eine adsorptive Bindung des Goldes an das Eiweiß zurückzuführen ist, würden diese Beobachtungen ebenso wie die unserigen dafür sprechen, daß Globulin eine größere „Affinität" zum Gold hat als Albumin. Das Wesen dieser Affinität, der Adsorbierbarkeit des Goldes an das Eiweiß, dürfte nicht elektrischer Natur sein; doch bedürfen diese Fragen noch eingehenderer Untersuchung[1]).

Bei der theoretischen Besprechung der zweiten Zone können wir uns kürzer fassen. Wir sehen sie an als die typische gegenseitige Fällung zweier Kolloide, wie sie bereits vor längerer Zeit an verschiedenen Systemen eingehend studiert ist (*Picton* und *Linder*, *Biltz* u. a.). Diese Untersuchungen haben insbesondere zwei allgemeine Gesetzmäßigkeiten aufgedeckt: eine Flockungsreaktion zwischen zwei Kolloiden kommt im allgemeinen nur dann zustande, wenn 1. die Kolloide entgegengesetzte Ladung tragen, 2. bestimmte gegenseitige Mengenverhältnisse vorliegen. Überwiegt eines der Kolloide, so wird die Flockung teilweise oder gänzlich verhindert. Die Erklärung dieser Erscheinungen ergibt sich aus den Vorstellungen über die Bedeutung der elektrischen Ladungen der Mizellen für die Stabilität der kolloidalen Lösungen. Es sei diesbezüglich auf die Lehrbücher der Kolloidchemie verwiesen. Hervorgehoben sei nur zu Punkt 1, daß die Ladung der Eiweißkörper infolge ihrer Ampholytnatur in erster Linie von der h des Mediums abhängig ist; nur wenn diese größer ist als die des isoelektrischen Punktes, tragen Eiweißkörper positive, also dem negativen Gold entgegengesetzte Ladungen. Daraus folgt, daß nur in saurer Lösung Eiweiß Gold flocken kann, und da bei unserer Versuchsanordnung die Acidität des Goldsol-Eiweißgemisches in erster Linie

---

[1]) *Anmerk. b. d. Korrektur:* Inzwischen habe ich noch folgende Versuche angestellt, die wohl eindeutig beweisend dafür sind, daß im Albumin-Globulin-Gemisch das kolloidale Gold nur mit dem Euglobulin in Verbindung tritt: ein Serum (1 Teil)-Goldsol (5 Teile)-Gemisch wurde mit gesättigter Ammonsulfatlösung in verschiedenen Mengenverhältnissen versetzt. Bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat (Euglobulinfällung) war das gesamte Gold im Niederschlag enthalten. Die überstehende, Albumin und Pseudoglobulin enthaltende Lösung war ungefärbt. In alkalischem und saurem Medium war das Ergebnis gleichartig.

durch die des Goldsols bestimmt wird, erscheint die Tatsache, daß alkalische Goldlösungen nicht durch Eiweiß geflockt werden, vollkommen verständlich. Erklärlich wird ferner, daß mit abnehmender Goldsolacidität die Zone 2 zunächst etwas in die Region höherer Serumkonzentration rückt, daß also die Umschlagszahl größer wird. Denn mit zunehmender *h* wächst innerhalb gewisser Grenzen die elektrische Ladung des Eiweißes, so daß in stärker saurem Medium eine geringere Menge Eiweiß nötig ist, um die zur Flockung des negativen Goldes erforderlichen positiven Ladungen aufzubringen, als bei schwächerer Acidität. Da weiterhin der isoelektrische Punkt der verschiedenen Eiweißstoffe nicht bei derselben *h* liegt (für Albumin z. B. bei höherer *h* als für Globulin), so muß, damit der Eiweißkörper positive Ladung bekommt, die *h* des Mediums einen verschiedenen unteren Grenzwert haben. So könnte aus diesem Grunde Albumin erst bei höherer Acidität als Globulin Gold flocken, und der im Zusammenhang mit der „Goldsolreaktion" mehrfach erhobene Befund, daß nur Globuline, nicht aber Albumine ein Goldsol flocken können [*Fischer* (12) u. a.], verständlich werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse über die Flockungsreaktionen zwischen kolloidalem Gold und Eiweißkörpern.

Die Flockung des kolloidalen Goldes durch Eiweiß kann durch zwei verschiedenartige Vorgänge bedingt sein. Es kann sich erstens um einen Prozeß handeln, der eine typische gegenseitige Fällung zweier Kolloide darstellt. Derartige Reaktionen sind vor allem dadurch ausgezeichnet, daß eine Fällung dann zustande kommt, wenn die Kolloide entgegengesetzt geladen sind. Da Eiweißkörper als Ampholyte eine dem negativen Golde entgegengesetzte, also positive Ladung nur dann aufweisen, wenn die *h* des Mediums größer ist als die des isoelektrischen Punktes, so kommt dieser Vorgang auch nur in einem Medium in Betracht, dessen *h* auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes liegt. Charakteristisch ist für die Fällung entgegengesetzter geladener Kolloide weiterhin, daß die Flockung nur bei ganz bestimmten gegenseitigen Mengenverhältnissen vor sich geht (*Biltz*sche Regel).

Der zweite Flockungsmodus besteht in folgendem: Eiweiß geht mit Gold, wie wir nach *Zsigmondy* annehmen müssen, eine adsorptive Bindung ein. Hierdurch verliert das Gold einerseits seine ihm eigentümlichen Reaktionen, z. B. die Elektrolytempfindlichkeit (Schutzwirkung des Eiweißes); andererseits dagegen macht es alle Reaktionen des Eiweißes mit. Ist nun letzteres durch bestimmte Eingriffe, wie z. B. das Globulin durch Veränderung der H-Ionenkonzentration, ausflockbar, so wird das adsorptiv gebundene Gold mit ausfallen. Globuline

können Gold also auch dadurch flocken, daß die Reaktion des Mediums der isoelektrischen Zone des Globulins (bzw. des Globulin-Goldkomplexes) entspricht.

Die beiden verschiedenen Flockungstypen weisen charakteristische Unterschiede auf. Für die Flockung des Goldes durch Eiweiß als „Fällung entgegengesetzt geladener Kolloide" ist bemerkenswert, daß die Flockung

1. nur durch sehr geringe Eiweißmengen bewirkt wird (Größenordunng 0,002 mg für 10 ccm Gold = „Umschlagszahl" *Zsigmondys*),

2. meist vollkommen irreversibel ist,

3. sich vor allem durch Farbveränderung des Goldes und Bildung eines blauen Niederschlags von sehr geringer Menge manifestiert.

Für die Ausflockung des Eiweiß-Goldkomplexes im isoelektrischen Punkte dagegen ist charakteristisch, daß sie

1. bei *jeder* Eiweißkonzentration (bis zu einer sehr niedrig gelegenen unteren Grenze) vor sich gehen kann,

2. vollkommen reversibel ist bei Zusatz von Säure oder Alkali, sobald die h der isoelektrischen Zone überschritten ist,

3. vor allem in Erscheinung tritt durch eine Trübung und nachfolgende Ausflockung von reichlichen groben, rotgefärbten Partikeln. Das Gold verändert seine Farbe also nicht.

Die beiden auseinandergehaltenen Flockungstypen haben im Grunde das Gemeinsame, daß beide Male die Flockung dadurch zustande kommt, daß die für die Stabilität des Sols maßgebliche elektrische Ladung des Gold-Eiweißkomplexes zu gering wird. Unterschiedlich ist aber die Art und Weise, *wie* die Entladung bewerkstelligt wird. Einmal gleichen sich die entgegengesetzten elektrischen Ladungen des negativen Goldes und positiven Eiweißes aus. Im anderen Falle kommt die Entladung durch Veränderung der Ionisierungsverhältnisse der Eiweißkörper unter dem Einfluß besonders der H-Ionen zustande.

Daraus ergibt sich, daß eine Kombination beider Flockungsmechanismen durchaus möglich ist. Es kann natürlich sehr wohl ein Teil des Eiweißes durch Änderung der Dissoziation, der Rest durch das Gold entladen werden. Dann vermengen sich die oben auseinandergehaltenen Unterschiede der Erscheinungsweise der Flockungstypen; gleichzeitig treten Trübung und Farbveränderung auf. Die Reversibilität wird unvollständig. Diese Kombination tritt ein, wenn die Bedingungen für das Zustandekommen beider Flockungsmechanismen gleichzeitig gegeben sind. Bedingung für Typ 1 ist vor allem eine relativ geringe Eiweißkonzentration. Bedingung für Typ 2 die h der isoelektrischen Zone. Diese Voraussetzungen sind häufig vorhanden.

Die Flockung von Mastix durch Eiweißkörper.

Im Hinblick auf die Frage, ob die festgestellten Beziehungen zwischen Eiweiß und Gold allgemein zwischen Eiweiß und negativen Suspensionskolloiden bestehen, haben wir in entsprechender Versuchsanordnung die Fällung von kolloidaler Mastixharzlösung untersucht. Von diesen Versuchen sei nur kurz berichtet, daß hier bei Anwendung eines *sauren Mastixsols* (Herstellung: 40 ccm 0,5 proz. alkoholischer Mastixlösung schnell unter Schütteln in 80 ccm Wasser gegossen, dazu 0,8 ccm n/10 Essgisäure) ebenfalls wie beim Gold zwei Flockungszonen auftraten. Die Fällung der ersten, im Gebiet der höchsten Serumkonzentration liegenden Zone ist im Gegensatz zur Zone 2 bei Zusatz von Alkali, Säure oder Kochsalz reversibel. Natürlich zeigt das äußere Bild der Flockung nicht die beim Gold hervortretende Mannigfaltigkeit, da ja die Ausflockung des Mastix ebenso wie die des Eiweißes nur die *Trübung* als Zwischenphase aufweist.

Zum Phänomen der unregelmäßigen Reihen.

Wir glauben, mit unseren Untersuchungen einen Fall von unregelmäßigen Reihen einer verhältnismäßig einfachen theoretischen Erklärung zugeführt zu haben. Es fragt sich, inwieweit die Ergebnisse verallgemeinert werden dürfen. Wir müssen hierzu sagen, daß in den meisten anderen Fällen von unregelmäßigen Reihen die Verhältnisse komplizierter zu liegen scheinen als in dem unserigen. Das gilt z. B. für die Untersuchungsobjekte von *Pauli* und *Flecker* (13). Diese Autoren kamen übrigens, wie hier betont sei, zu Ergebnissen, die sich in manchen Punkten mit den unserigen berühren. Aus verschiedenen Gründen liegen in unserem System besonders günstige Voraussetzungen für die Forschung vor, insofern nämlich, als einerseits die in Betracht kommenden physiko-chemischen Eigentümlichkeiten des Eiweißes, besonders seine Ampholyteigenschaften, bereits ziemlich genau bekannt sind, andererseits auch das Verhalten des kolloidalen Goldes im allgemeinen vielleicht klarer liegt als das vieler anderer Kolloide. Einfacher ist unser System ferner noch dadurch, daß in ihm von anorganischen Ionen nur $H^{\cdot}$ und OH' zu berücksichtigen sind, während sonst meist noch Salze eine Rolle spielen.

Unregelmäßige Reihen sind außer bei den Eiweißkörpern bisher vor allem bei der Flockung der kolloidalen Metallhydroxyde (Eisen-, Aluminium-, Thoriumhydroxyd und andere) beobachtet worden. Betrachten wir diese Tatsache unter der Berücksichtigung unserer Ergebnisse, so fällt uns auf, daß diese Kolloide ebenso wie die Eiweißkörper *Ampholyteigenschaften* haben, was bisher nicht sehr beachtet zu sein scheint. Da wir bei der Fällung des Goldes durch Eiweiß dessen Ampholytnatur als einen integrierenden Faktor des einen Flockungsmodus ansehen müssen, halten wir diese Feststellung für wesentlich. Wir möchten uns aber mit diesem Hinweis begnügen und die Frage

einer *allgemeineren* Geltung unserer Ergebnisse aus den oben angedeuteten Gründen zunächst weiteren Untersuchungen überlassen.

Literatur.

1) *Zsigmondy*, Kolloidchemie. III. Aufl., 1920. — 2) *Derselbe*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **96**, 265, 1916. — 3) *Gann*, Kolloidchem., Beihefte, 8, 251, 1916. — 4) *Zsigmondy* und *Joel*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **113**, 299, 1924. — 5) *Krebs*, Klin. Wochenschr. 1925. — 6) *Rona* und *Michaelis*, diese Zeitschr. **28**, 193, 1910. — 7) *Ruppel*, *Ornstein*, *Carl* und *Lasch*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 188, 1923. — 8) *Samson*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **41**, 311, 1924. — 9) *Michaelis* und *Rona*, diese Zeitschr. **94**, 225, 1919. — 10) *Heubner* und *Jacobs*, ebendaselbst **58**, 352, 1913. — 11) *Reitstötter*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **30**, 468, 1920. — 12) *Fischer* Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **14**, 60, 1921. — 13) *Pauli* und *Flecker*, diese Zeitschr. **41**, 470, 1912.

Eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der gallensauren Salze im Blute.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Paul Szilárd.

(Aus der IV. medizinischen Universitätsklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 10. April 1925.)

Ungefähr vor 10 Jahren berichtete *Lifschütz* (1) in einer Reihe von Mitteilungen über eine neue, für die Oxycholesterine charakteristische Farbenreaktion. Er fand nämlich, daß das Cholesterin in Eisessiglösung nach Oxydierung durch Benzoylsuperoxyd nach Hinzugabe einer Mischung von Schwefelsäure und Eisessig eine sehr ausgesprochene grüne Farbenreaktion gibt. Die Entwicklung der grünen Farbe kann durch Hinzugabe eines Tropfens von 2,5proz. Eisessig-Ferrichloridlösung (Fe_2Cl_6) beschleunigt werden. Außer dem Oxycholesterin geben nur die Gallensäuresalze dieselbe Reaktion, sonst jedoch kein anderer Stoff.

Die Möglichkeit der kolorimetrischen Bestimmung der Gallensäuresalze im Blute schien auf der Hand liegend, man mußte nur aus dem Blutserum einen solchen Extrakt verfertigen, welcher auch die Gallensäuresalze enthält, und aus diesem das Cholesterin entfernen.

Nach einiger Zeit wurde ein sehr einfaches Verfahren gefunden, das in folgendem besteht:

5 ccm Blutserum tropfen wir aus einer Pipette in 150 ccm absoluten Alkohol oder absoluten Methylalkohol. Während dieses Prozesses ist der Alkohol in ständiger Bewegung zu halten, wodurch das Knotigwerden des präzipitierten Stoffes vermieden wird. Während wir die Flüssigkeit in ständiger Bewegung halten, lassen wir sie im Wasserbad aufkochen. Nach dem Aufkochen geben wir ein wenig Tierkohle hinzu, um den Gallenfarbstoff auszuscheiden, dann mit diesem vermengt, kochen wir wieder auf und filtrieren. Das Glas spülen wir zwei- bis dreimal mit absolutem Alkohol aus und filtrieren die Spülflüssigkeit ebenfalls. Die Flüssigkeit dunsten wir im Wasser-

bad bis zu 15 ccm ein, und nachdem sie etwas abgekühlt ist, geben wir sukzessive 100 ccm Äther dazu. Durch die Wirkung des Äthers werden die Gallensäuresalze ausgefällt, während die Lipoide und in erster Reihe das Cholesterin, in der Lösung bleiben.

2 bis 3 Stunden im Eiskasten gehalten, klärt sich die trübe Flüssigkeit auf. Dann wird die Ätheralkoholmischung vorsichtig abgesaugt, die Ausfällung mit Äther drei- bis viermal dekantiert, und zuletzt lassen wir die kleine, anders nicht entfernbare Menge Äther im Wasserbad verdunsten. Nachher lösen wir bei schwacher Erwärmung den Niederschlag in 5 ccm Eisessig auf.

Zur kolorimetrischen Bestimmung dient die *Lifschütz*sche Farbenreaktion. Wie erwähnt, geben nur das Oxycholesterin und die Gallensäurensalze die Reaktion, das Cholesterin aber ist bereits auf die oben erwähnte Weise ausgeschieden worden.

Zu der aus dem Serum extrahierten Eisessiglösung der Gallensäuresalze geben wir etwas Benzoylsuperoxyd, welches sich, besonders bei Erwärmung, leicht löst. Währenddessen zeigt sich etwas Gasentwicklung.

Nachdem sich das Benzoylsuperoxyd vollkommen aufgelöst und die Gasentwicklung aufgehört hat, kochen wir die Lösung rasch, aber energisch zwei- bis dreimal auf und kühlen sie geschwind ab, geben dann 1 ccm Säuremischung (1 Volumen konzentrierte Schwefelsäure und 10 Volumen Eisessig) dazu, worauf sich die Flüssigkeit sukzessiv grün färbt. Die vollkommene Entwicklung der Farbe nimmt beiläufig 10 bis 15 Minuten in Anspruch, dies kann man jedoch dadurch beschleunigen, daß man einen Tropfen 2,5proz. Eisessig-Ferrichloridlösung dazu gibt.

Die Beschleunigung der Entwicklung der Reaktion ist zweckmäßig, weil wir so unverzüglich zur Ablesung schreiten können. Als Standard benutzen wir chemisch reine Gallensäuresalzmischung, welche drei Teile Natrium glykocholicum und einen Teil Natrium taurocholicum enthält (also annähernd ebensoviel wie die menschliche Galle), in Eisessiglösung. Die Standardlösung behandeln wir ebenso wie die Unbekannte.

Die Reaktion ist sehr empfindlich.

Literatur.

1) *Lifschütz*, diese Zeitschr. **48**, 375, 1913; **54**, 213, 1913; **62**, 219, 1914; Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 181; **91**, 315, 1914; **92**, 385, 1914.

Vergleichende Untersuchungen über die Toxizität der Saponine und die Entgiftung durch Cholesterin.

Von

L. Kofler und **W. Schrutka.**

(Aus dem pharmakognostischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. April 1925.)

Über die physiologischen Wirkungen der Saponine finden sich in der Literatur zahlreiche wertvolle Angaben. Ein Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Autoren ist aber aus verschiedenen Gründen häufig nicht durchführbar. In vielen Fällen ist nur das Wort Saponin ohne nähere Bezeichnung der Stammpflanze angegeben. Die für irgend ein Saponin gefundenen Werte lassen sich aber bei der großen Mannigfaltigkeit dieser Körperklasse nicht ohne weiteres auf alle Saponine übertragen. Aber auch dort, wo die Stammpflanze des Saponins genannt ist, läßt sich der Reinheitsgrad und die Art der Gewinnung nicht ersehen. Beide Umstände sind aber für die physiologische Wirkung eines Saponins von großer Bedeutung, da nach neueren Untersuchungen durch die üblichen Gewinnungs- und Reinigungsverfahren die Saponine weitgehend verändert werden können [*Kofler* und *Dafert* (11), *Merck* (14)]. Dazu kommt noch eine verschiedene Arbeitsweise bei der Durchführung des physiologischen Versuchs. Aus diesen Gründen lassen sich nicht einmal die von verschiedenen Autoren angegebenen Werte über die Hämolysewirkung miteinander vergleichen. Die in zusammenfassenden Darstellungen mitunter angeführten Tabellen, in denen die einzelnen Saponine nach der Stärke ihrer hämolytischen Wirkung verglichen werden, haben daher nur bedingten Wert, da die Zahlen für den hämolytischen Index verschiedenen Autoren entnommen sind.

Vergleichende Versuche über die physiologische Wirkung der einzelnen Saponine auf verschiedene Organismen oder auf denselben Organismus bei verschiedener Applikationsweise liegen nur spärlich vor. *Wada* (20) fand, daß die Wirkung verschiedener Saponine auf rote Blutkörperchen und auf Trypanosomen im allgemeinen parallel geht, daß also die am stärksten hämolysierenden Saponine auch die stärkste Trypanosomenwirkung zeigen. *Kofler* (7) fand bei acht untersuchten Saponinen, daß hämolytischer und „Fischindex“ zwar nicht genau parallel gehen,

daß aber immerhin ein gewisser Zusammenhang zwischen der hämolytischen und der Wirkung auf Fische besteht. Beim Vergleich von Sapindus-, Quillaja- und Guajacrindensaponin kamen *Gaisböck* und *Bayer* (2) zu dem Ergebnis, daß die allgemeine Giftigkeit, beurteilt nach der tödlichen Wirkung auf dem Wege über das Nervensystem (Krämpfe, Atemlähmung) weder mit der Hämolyse in vitro, noch mit der Knochenmarkswirkung parallel geht.

Im Folgenden stellten wir mit elf verschiedenen Saponinen vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung bei verschiedener Applikationsweise an und verglichen diese Wirkungen mit dem Cholesterinbindungsvermögen der Saponine.

Die zu den Versuchen verwendeten Saponine waren: Digitonin, Sapotoxin, Senegin, Saponin. pur. albiss., Guajacrinden- und Roßkastaniensaponin der Firma *E. Merck*, Sapindussaponin von *Hoffmann La Roche*, das Handelssaponin der Firma *Sthamer* und ein englisches als Powderedsaponin bezeichnetes Präparat. Das Gypsophilasaponin wurde aus der großen, weißen Seifenwurzel (Gypsophila paniculata) hergestellt und durch Behandeln im *Pauli*schen Elektrodialyseapparat gereinigt [*Kofler* und *Dafert* (11)]. Die Primulasäure gelangte in reiner kristallisierter Form zur Anwendung. Da sie als saures Saponin in Wasser unlöslich ist [*Kofler* (8)], wurde sie durch Zusatz von Natronlauge in Lösung gebracht.

Für die intravenösen und subkutanen Injektionen und die Verabreichung per os wurden weiße Mäuse verwendet. Die Dosierung wird im folgenden in Milligrammen pro Gramm Körpergewicht angegeben. Die *intravenöse* Injektion erfolgte in die Schwanzvene. Die Lösungen der Saponine in physiologischer Kochsalzlösung wurden so hergestellt, daß die injizierte Flüssigkeitsmenge 0,15 ccm nicht überschritt. Kurze Zeit nach der Injektion begannen die Mäuse kräftig zu schwitzen und waren je nach der Dosis einige Stunden bis Tage hindurch förmlich in Schweiß gebadet. Dabei zeigten die Tiere großen Durst. Gleichzeitig stellte sich eine Augenentzündung mit so starker Schwellung der Lider ein, daß die Tiere die Augen nicht öffnen konnten. Bei subletalen Dosen traten diese Erscheinungen nur in schwächerem Grade auf und gingen rascher wieder zurück. Schweißausbruch und Augenentzündung sind so regelmäßige Erscheinungen, daß wir aus ihrem Auftreten oder Ausbleiben bei einem Versuch Schlüsse auf die starke oder schwache Wirksamkeit der angewendeten Dosis ziehen konnten.

Die Feststellung der *schweißtreibenden Wirkung* erscheint uns deshalb wichtig, weil bisher eindeutige Versuche über die Beeinflussung der Schweißsekretion durch Saponine nicht vorliegen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß viele schon seit Jahrhunderten verwendete „schweißtreibende“ Tees Saponindrogen enthalten. Daß die Wirkung am Menschen eine unzuverlässige ist und immer wieder angezweifelt wurde, steht im Zusammenhang mit den unbeherrschbaren Resorptionsverhältnissen der Saponine bei oraler Verabreichung [*Kofler, Kollert* und *Grill* (12)].

Weiße Mäuse scheinen intravenös bedeutend höhere Dosen pro Gramm Körpergewicht zu vertragen als die anderen bisher untersuchten Säuge-

tiere. Für Primulasäure war die tödliche Dosis beim Hunde 0,8 mg pro Kilogramm, beim Kaninchen, das als relativ widerstandsfähig gegen Saponine gilt, 3 bis 4 mg, bei Mäusen dagegen wirkten erst 15 mg pro Kilogramm tödlich (Tabelle I). Für Senegin gibt *Atlas* (1) bei Katzen 4,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht an, wir fanden bei den Mäusen 45 mg.

Mit Rücksicht auf die Befunde von *Isaac* und *Moeckel* (5), *Pappenheim* und *Szécsi* (17), *Kagan* (6), *Gaisböck* und *Bayer* (2), welche bei Kaninchen nach intravenösen Saponininjektionen im Blute das Auftreten kernhaltiger roter Blutkörperchen beobachteten, untersuchten wir das Blutbild in dieser Richtung. Es wurden den Mäusen in einer Versuchsreihe die tödliche Dosis, in einer anderen 75 Proz. der tödlichen Dosis intravenös eingespritzt und das Blut nach 24 Stunden und, soweit die Tiere noch am Leben waren, nach 48 und 72 Stunden untersucht. In *keinem einzigen Falle* konnten *Normoblasten* gefunden werden. Mäuse scheinen sich also in bezug auf die Knochenmarksreizung durch Saponine anders zu verhalten als Kaninchen. Literaturangaben über andere Tiere als Kaninchen liegen unseres Wissens nicht vor.

Bei der *oralen Verabreichung* wurden die Saponine in Lösung durch einen dünnen Gummischlauch in den Magen eingespritzt, als Höchstmenge kamen 0,5 ccm Flüssigkeit zur Verwendung. Bei tödlichen Dosen trat nach längerer Zeit Schweißausbruch und Augenentzündungen auf, doch waren diese Erscheinungen meist nicht so heftig wie nach intravenöser Injektion.

Tabelle I.

	mg Saponin pro g Maus (Eintritt des Todes nach Tagen)		
	intravenös	per os	subkutan
Digitonin	0,01 (2 Tagen)	0,09 (2 Tagen)	0,2 (1 Tage)
Primulasäure	0,015 (4 „)	0,2 (6 „)	0,03 (3 Tagen)
Gypsophilasaponin . .	0,015 (3 „)	2,0 (3 „)	0,1 (3 „)
Sapotoxin	0,02 (1 Tage)	1,0 (1 Tage)	0,08 (2 „)
Sthamersaponin	0,02 (1 „)	6,0 (2 Tagen)	0,08 (3 „)
Senegin	0,045 (2 Tagen)	1,0 (3 „)	0,03 (3 „)
Saponin pur. albiss. . .	0,06 (3 „)	2,0 (3 „)	0,06 (4 „)
Powderedsaponin . . .	0,1 (4 „)	1,5 (2 „)	0,1 (5 „)
Guajacsaponin	0,8 (2 „)	10,0 (3 „)	0,5 (3 „)
Roßkastaniensaponin .	0,9 (1 Tage)	3,0 (3 „)	1,0 (7 „)
Sapindussaponin . . .	1,0 (1 „)	3,0 (1 Tage)	0,9 (5 „)

Interessant ist der Vergleich zwischen der letalen intravenösen und oralen Dosis bei den einzelnen Saponinen. In allen Fällen wurde oral ein Vielfaches der intravenös tödlich wirkenden Dosis vertragen. Doch ist die Differenz bei den einzelnen Saponinen beträchtlich verschieden. Beim Sapindussaponin ist die tödliche Dosis bei oraler Verabreichung das Dreifache der intravenös tödlichen Dosis, beim Saponin *Sthamer* das Dreihundertfache, die anderen untersuchten Saponine liegen dazwischen. Für die Erklärung dieser Verschiedenheiten sind mehrere Faktoren naheliegend: Der Abbau der Saponine durch die Verdauungssäfte und die Darmflora und die verschieden leichte Resorbierbarkeit. Letztere steht wohl im Zusammenhang mit der Löslichkeit und der Teilchengröße des betreffenden

Saponins in wässeriger Lösung und seiner Reizwirkung auf die Schleimhaut des Verdauungstraktes.

Die *subkutane* Injektion führte stets zu der bekannten sterilen Eiterung an der Injektionsstelle [*Neumayer* (16)]. Wie zu erwarten, war in den meisten Fällen die letale Dosis höher als bei der intravenösen Injektior. Nur bei drei Saponinen lag die subkutane Dosis etwas unter der intravenösen.

Die *Zeitdauer bis zum Eintritt des Todes* war, wie dies auch für andere Tiere bei Saponinvergiftungen bekannt ist, eine verhältnismäßig lange. Die Tiere starben nach 1 bis 6 Tagen. Bei den subkutanen Injektionen trat der Tod durchschnittlich etwas später ein als bei intravenöser oder oraler Verabreichung.

Der *hämolytische Index* wurde in der üblichen Weise mit einer Aufschwemmung von Blut in 50 Teilen physiologischer Kochsalzlösung bestimmt. Die Ablesung wurde nach 24 Stunden vorgenommen und die totale Hämolyse als Endtiter gewertet. Um Blut zu sparen, gaben wir in jede Eprouvette nur 1 ccm Blutaufschwemmung und dementsprechend auch nur 1 ccm Saponinlösung bzw. Saponinkochsalzlösung. Die endgültigen Bestimmungen wurden nach einigen Vorversuchen gleichzeitig an demselben Tage mit dem Blute einer Ratte ausgeführt, so daß die gewonnenen Werte tatsächlich miteinander vergleichbar sind. Sie sind in der Tabelle II zusammengestellt. Die Zahlen geben also die Verdünnung an, in der das Saponin eben noch totale Hämolyse hervorzurufen vermag.

Tabelle II.

	Hämolytischer Index		Hämolytischer Index
Digitonin	180,000	Senegin	25,200
Primulasäure	180,000	Sthamersaponin . .	22,500
Gypsophilassaponin . .	178,000	Saponin. pur. albiss.	22,500
Sapindussaponin . . .	75,000	Roßkastaniensapon.	22,500
Powderedsaponin . . .	75,000	Guajacsaponin . . .	1000
Sapotoxin	56,300		

Beim Vergleich dieser Werte mit den letalen intravenösen Dosen ergibt sich eine gewisse Übereinstimmung. Die drei am stärksten hämolytisch wirkenden Saponine sind auch bei intravenöser Verabreichung am giftigsten. Guajac- und Roßkastaniensaponin sind intravenös, subkutan und per os und in vitro hämolytisch schwach wirksam.

In einer weiteren Versuchsreihe bestimmten wir den „*Fischindex*" [*Kofler* (7)], welcher die Verdünnung des Saponins angibt, bei der Fische innerhalb einer Stunde absterben. Wir verwendeten Karauschen (Carassius vulgaris) von 2 bis 5 cm Länge. Sie wurden in Schalen mit 100 ccm Wasser gegeben, dem Saponin in steigender Konzentration zugesetzt war (Tabelle III).

Ferner verglichen wir die Reizwirkung von Saponinlösungen auf *Kaninchenaugen*, wobei wir jene Verdünnung der wässerigen Saponinlösung zu ermitteln suchten, von der ein Tropfen, in den Bindehautsack gebracht, eine nach 24 Stunden deutlich erkennbare Entzündung hervorrief. Die Verdünnungen, in denen diese Wirkung eintrat, sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

	Fischindex	Reizwirkung auf das Kaninchenauge
Digitonin	198,000	230,000
Primulasäure	36,400	110,000
Saponin. pur. albiss.	11,000	1500
Sapindussaponin	10,000	3500
Sapotoxin	2800	2500
Senegin	2000	1000
Powderedsaponin	1900	1000
Roßkastaniensaponin	1800	1000
Sthamersaponin	1400	900
Gypsophilasaponin	580	900
Guajacsaponin	< 200	1000

Digitonin und Primulasäure sind auch hier wieder am stärksten wirksam. Guajacsaponin am wenigsten. Auffallend ist die schwache Wirkung des Gypsophilasaponins auf Fische und die Augenschleimhaut, da dieses Saponin stark hämolytisch wirkt und bei intravenöser Injektion ebenso giftig ist wie Primulasäure. Vielleicht hängt dies damit zusammen, daß Gypsophilasaponin überhaupt nicht oder wenigstens viel langsamer dialysiert als die meisten anderen Saponine, worüber an anderer Stelle ausführlicher berichtet wird. Die Versuchsergebnisse an Fischen und am Kaninchenauge zeigen verhältnismäßig gute Übereinstimmung.

Endlich wurde auch die *Geschmacksintensität* der Saponine verglichen. Die Saponine wurden in Wasser gelöst und die Lösungen so weit verdünnt, als überhaupt noch ein Geschmack wahrnehmbar war. Dabei konnte die bekannte Erscheinung, daß die Saponine noch in großer Verdünnung kratzend schmecken, zahlenmäßig verfolgt werden. Tabelle IV zeigt die Verdünnungen, in denen der Geschmack der Saponine eben noch erkennbar war.

Tabelle IV.

	Geschmacksgrenze		Geschmacksgrenze
Digitonin	380,000	Sapindussaponin	130,000
Saponin. pur. albiss.	300,000	Sthamersaponin	100,000
Primulasäure	250,000	Powderedsaponin	100,000
Senegin	250,000	Gypsophilasaponin	80,000
Guajacsaponin	200,000	Sapotoxin	80,000
Roßkastaniensaponin	200,000		

Abgesehen von dem starken Geschmack des Digitonins läßt sich keinerlei Übereinstimmung zwischen der Geschmacksintensität der einzelnen Saponine und ihrer Giftwirkung erkennen.

Wenn man von den Versuchen über die Geschmacksintensität der Saponine absieht, so ergibt sich aus den beschriebenen Versuchen folgendes: Bei der intravenösen und oralen Verabreichung an weiße Mäuse, gegen rote Blutkörperchen, gegen Fische und beim Einträufeln ins Kaninchenauge sind *Digitonin und Primulasäure die giftigsten von*

den elf untersuchten Saponinen. Guajac- und Roßkastaniensaponin erwiesen sich bei allen Versuchen als verhältnismäßig wenig giftig. Die übrigen sieben untersuchten Saponine stehen in der Mitte ohne eine durchgehend gültige Anordnung nach der Reihenfolge ihrer Giftigkeit erkennen zu lassen. Was den Vergleich des hämolytischen Index mit der Toxizität bei intravenöser Injektion anbelangt, so zeigt sich dort eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung. Nur beim Sapindussaponin ist, trotz des verhältnismäßig hohen hämolytischen Index, die Wirkung nach intravenöser Injektion schwächer als bei allen anderen Saponinen. Auf die verhältnismäßig große Übereinstimmung in der Giftigkeit auf Fische und der Reizwirkung auf das Auge wurde schon hingewiesen.

Entgiftung der Saponine durch Cholesterin.

Anschließend an die Versuche, welche die Toxizität der einzelnen Saponine verglichen, suchten wir nach chemischen oder physikalischen Eigenschaften der Saponine, welche eine Erklärung für die großen quantitativen Verschiedenheiten im physiologischen Verhalten der Saponine zu liefern imstande wären. Schon vor mehreren Jahren hatte der eine von uns nachgewiesen, daß zwischen der Oberflächenaktivität und der Toxizität der Saponine gegen Fische und rote Blutkörperchen kein Zusammenhang besteht (7).

Es war nun naheliegend, an eine andere auffallende und biologisch wichtige Eigenschaft der Saponine zu denken, an ihr Bindungsvermögen für Cholesterin. Bekanntlich wurden seit der Beobachtung *Ransoms* (18), daß Cholesterin imstande ist, Saponin zu entgiften, zahlreiche Versuche in dieser Richtung angestellt. Durch zahlreiche spätere Arbeiten wurde versucht, den Mechanismus der Saponinhämolyse aufzuklären, ein Ziel, das noch nicht vollständig erreicht ist. Ein großer Teil der Autoren ist der Ansicht, die Saponinhämolyse komme dadurch zustande, daß das Saponin sich mit dem Cholesterin der Erythrocyten verbinde und dadurch die Struktur des Stromas störe. Andere suchen den Angriffspunkt des Saponins im Lecithin, nehmen aber an, daß das Cholesterin auch innerhalb des Erythrocyten eine Art Schutzwirkung entfalte, da es zum Saponin eine etwas größere Affinität besitze, daher mit ihm eine Verbindung eingehe und vom Lecithin ablenke. Die Blutkörperchen sind daher der Saponinhämolyse gegenüber um so resistenter, je mehr Cholesterin im Verhältnis zum Lecithin sie enthalten [*K. Meyer* (15)]. Beim Vergleich der Erythrocyten verschiedener Tierarten zeigte sich, daß die roten Blutkörperchen um so widerstandsfähiger gegen die Saponinhämolyse sind, je mehr Cholesterin sie enthalten. Neuerdings wird von *Lepeschkin* (13) als Ursache der Hämolyse eine Zersetzung der Verbindung von Hämoglobin mit Lipoiden

angenommen, die die Hauptmenge des Stromas der Blutkörperchen bilden soll. Welcher Auffassung man sich auch anschließen will, bei allen Erklärungsversuchen kommt dem Cholesterin eine große Bedeutung zu. Es wurde daher auch schon wiederholt, unter anderen von *Yagi* (22), die Ansicht ausgesprochen, daß die verschieden starke hämolytische Wirkung der Saponine auf ein verschiedenes Cholesterinbindungsvermögen zurückzuführen sei. Vergleichende Versuchsreihen mit einer größeren Anzahl von Saponinen liegen bisher aber nicht vor.

Mit den eingangs aufgezählten elf Saponinen stellten wir quantitative Versuche über das Bindungsvermögen für Cholesterin an. Wir verwendeten anfangs die von *Ransom* (18), *Hausmann* (3) und anderen benutzte Methode, indem wir die Saponine in physiologischer Kochsalzlösung lösten und mit einer ätherischen Cholesterinlösung schüttelten, mehrere Stunden bei 35 bis 40° im Thermostaten beließen, den Äther verjagten, filtrierten und auf Hämolysewirkung prüften. Bei dieser Arbeitsweise erreichten wir zwar eine Entgiftung der Saponine, in quantitativer Hinsicht waren die Resultate aber unbefriedigend. Es spielt dabei offenbar die Zeit des Schüttelns, die Aufenthaltsdauer im Thermostaten, die Temperatur usw. eine Rolle. Aber selbst bei möglichst genauer Einhaltung bestimmter Bedingungen gelang es nicht, bei Wiederholung des Versuchs übereinstimmende Werte zu erhalten. Die Verwendung einer Cholesterinsuspension an Stelle der ätherischen Lösung gab ebenfalls keine übereinstimmenden Werte. Hier verursachte wohl der Umstand eine Ungleichmäßigkeit in den Ergebnissen, daß die Suspensionen nicht immer von gleichem Dispersitätsgrad und gleicher Haltbarkeit waren.

Übereinstimmende Resultate auch bei Wiederholung des Versuchs ergaben sich dagegen bei folgender Versuchsanordnung: Die Saponine wurden im Verhältnis 1 : 1000 in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, das Cholesterin in Aceton im Verhältnis 1 : 1000. Zur Anstellung des Versuchs wurde eine Reihe von Eprouvetten mit je 5 ccm Saponinlösung beschickt und mit steigenden Mengen Cholesterinlösung versetzt, z. B. 0,8, 1,0, 1,5, 1,7, 2,0 ccm. Die Eprouvetten wurden umgeschüttelt und 1 bis 2 Stunden in den Thermostaten bei 50° gestellt. Dabei verdampfte ein großer Teil des Acetons. Der Rest des Acetons wurde durch Einstellen der Eprouvetten in ein Wasserbad von 60° vertrieben. Dann wurde von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert und das Filtrat auf hämolytische Wirkung geprüft, indem 1 ccm der Lösung mit 1 ccm 2proz. Rattenblutaufschwemmung versetzt wurde. Die Ablesung erfolgte in allen Versuchen nach einer Stunde. Bei dem angeführten Beispiel, bei dem es sich um Digitonin handelte, erfolgte in den ersten drei Eprouvetten Hämolyse, bei der dritten und vierten Eprouvette, welche 1,7 bzw. 2,0 ccm Cholesterinlösung erhalten hatten, unterblieb die Hämolyse. Es wurden also 0,005 g Digitonin durch 0,0017 g Cholesterin oder 1 g Digitonin durch 0,34 g Cholesterin entgiftet. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit den chemischen Befunden von *Windaus* (21), wonach sich ein Molekül Cholesterin mit

einem Molekül Digitonin verbindet. Für 1 g Digitonin berechnet sich daher 0,34 g Cholesterin. Bei den anderen von uns untersuchten Saponinen liegen in der Literatur keine Untersuchungen vor, mit denen wir unsere Befunde vergleichen und kontrollieren könnten. Auf Grund der gut stimmenden Resultate beim Digitonin glauben wir uns aber zu der Annahme berechtigt, daß die angewendete Methode für den angestrebten Vergleich brauchbar ist. Dafür spricht auch der Umstand, daß wir bei Wiederholungen der Versuche stets dieselben Resultate erhielten, auch wenn die Versuchsbedingungen, namentlich die Einwirkungsdauer und die Temperatur nicht genau eingehalten wurden. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß bei anderen Saponincholesteriden, welche keine so festen Bindungen eingehen wie das Digitonin, die Dissoziation, wie sie *Riesenfeld* und *Lummerzheim* (19) für Cyclamincholesterid nachwiesen, eine Rolle spielt, so daß unsere Werte für die anderen Saponine nicht ohne weiteres als Äquivalentgewichte aufgefaßt werden dürfen.

Bei allen Saponinen wurde in der beschriebenen Weise vorgegangen, nur beim Guajacsaponin mußte die Saponinlösung im Verhältnis 1 : 100 hergestellt werden. Das Vertreiben des Acetons wurde so lange fortgesetzt, bis kein Geruch mehr wahrzunehmen war. Außerdem wurde folgender Kontrollversuch ohne Saponin aufgestellt: In zehn Eprouvetten wurde je 1 ccm Rattenblutaufschwemmung gegeben, dazu kam Aceton in steigender Menge und so viel physiologische Kochsalzlösung, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit in jeder Eprouvette 2 ccm betrug. Nach einer Stunde wurde das Resultat abgelesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt:

Tabelle V.

Blut ccm	Physiol. NaCl-Lösung	Aceton	Wirkung nach einer Stunde
1	0,9	0,1	Keine
1	0,8	0,2	"
1	0,7	0,3	"
1	0,6	0,4	Hämolyse
1	0,5	0,5	"
1	0,4	0,6	Schwache Hämolyse u. Agglutination
1	0,3	0,7	Agglutination
1	0,2	0,8	"
1	0,1	0,9	"
1	0	1,0	"

Bei der oben geschilderten Versuchsanordnung mit Saponin trat niemals Agglutination auf. Da aber auch die Hämolysewirkung erst bei großen Acetonmengen auftritt, die sich am Geruch mit Sicherheit erkennen lassen, so war von dieser Seite bei unseren Versuchen eine Fehlerquelle nicht zu erwarten.

Überraschend ist das Verhalten des Sapotoxins, das mehr als die doppelte Cholesterinmenge zu binden vermag wie das Digitonin. Wenn man vom Sapotoxin absieht, besteht zwischen der physiologischen Wirkung der Saponine und ihrem Cholesterinbindungsvermögen insofern eine gewisse Übereinstimmung, als Primulasäure und Digitonin an der Spitze stehen, das relativ ungiftige Roßkastanien- und Guajacsaponin am Ende der Reihe. Eine direkte Proportionalität zwischen dem Cholesterinbindungs-

Tabelle VI.

	1 g Saponin verbraucht zur Entgiftung g Cholesterin		1 g Saponin verbraucht zur Entgiftung g Cholesterin
Sapotoxin	0,7	Powderedsaponin . .	0,08
Primulasäure	0,4	Senegin	0,08
Digitonin	0,34	Sthamersaponin . . .	0,06
Saponin. pur. albiss. .	0,3	Roßkastaniensaponin	0,04
Gypsophilasaponin . .	0,16	Guajacsaponin	0,004
Sapindussaponin . . .	0,1		

vermögen und der physiologischen Wirkung besteht aber nicht. Am nächstliegenden wäre es gewesen, bei der hämolytischen Wirkung an eine weitgehende Übereinstimmung zu denken. Wenn man die Cholesterinwerte mit dem hämolytischen Index vergleicht, sieht man, daß eine solche Proportionalität nicht besteht. So haben Gypsophilasaponin und Primulasäure nahezu denselben hämolytischen Index, obwohl ersteres 0,16 g, letzteres 0,4 g Cholesterin verbraucht. Powderedsaponin und Senegin haben denselben Cholesterinverbrauch, im hämolytischen Index weichen sie aber weit voneinander ab. Es spielen bei der Hämolyse sicherlich noch verschiedene Faktoren eine Rolle, welche das Bindungsvermögen der Saponine für Cholesterin beeinflussen. In diesem Zusammenhang sei an die Untersuchungen von *Jahnsom-Blohm* (4) erinnert, der die Hemmung der Saponinhämolyse zum Teil als einen Adsorptionsvorgang betrachtet, wobei eine chemische Bindung allerdings nicht ausgeschlossen ist. Dieser Adsorptionsvorgang kann nun leicht durch andere Lipoide und auch durch Eiweißstoffe beeinflußt werden. Der Umstand, daß sich aus unseren Versuchen keine völlige Proportionalität zwischen Cholesterinbindungsvermögen und hämolytischer und anderen physiologischen Wirkungen der Saponine ergibt, spricht daher keineswegs gegen die Ansicht, daß der Angriffspunkt der Saponine hauptsächlich im Cholesterin zu suchen sei. Im biologischen Versuch wirken auf den Bindungsvorgang zwischen Saponin und Cholesterin, ob er nun mehr chemisch oder physikalisch sei, zweifellos noch Faktoren ein, die wir nicht mit Sicherheit beherrschen können.

Zusammenfassung.

Es wurden mit elf verschiedenen Saponinen vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung bei verschiedener Applikationsweise angestellt. Die Saponine wurden weißen Mäusen intravenös, subkutan und per os verabreicht.

Weiße Mäuse scheinen intravenös bedeutend höhere Dosen pro Kilogramm Körpergewicht zu vertragen als die anderen bisher untersuchten Säugetiere. Normoblasten wurden im Blute weder nach letalen, noch nach subletalen Dosen gefunden. Es traten starker Schweißausbruch und Augenentzündungen auf.

Bei oraler Verabreichung beträgt die tödliche Dosis ein Vielfaches (3- bis 300fach) der intravenösen Dosis.

Die subkutane Injektion führte zu der bekannten sterilen Eiterung an der Injektionsstelle und bei entsprechenden Dosen zum Tode.

Der Tod trat bei allen Applikationsweisen meist erst nach einigen Tagen ein.

Die drei in vitro am stärksten hämolytisch wirkenden Saponine: Digitonin, Primulasäure und Gypsophilasaponin wirken auch bei intravenöser Anwendung am giftigsten. Dagegen sind Guajac- und Roßkastaniensaponin intravenös, subkutan, per os und hämolytisch (in vitro) schwach wirksam. Fischen gegenüber und beim Einträufeln in die Augen von Kaninchen verhielten sich die Saponine ähnlich, nur war hier Gypsophilasaponin auffallend schwach wirksam.

Es wurde ermittelt, wieviel Cholesterin bei den einzelnen Saponinen notwendig ist, um sie hämolytisch unwirksam zu machen. An Stelle der bisher verwendeten ätherischen Cholesterinlösung, die für die quantitativen Versuche nicht zweckmäßig war, wurde eine Lösung von Cholesterin in Aceton benutzt.

Am meisten Cholesterin verbrauchte das Sapotoxin, es folgen dann Primulasäure und Digitonin, am wenigsten verbrauchten Roßkastanien- und Guajacsaponin. Eine direkte Proportionalität zwischen Cholesterinbindungsvermögen und der Toxizität der Saponine scheint nicht zu bestehen.

Literatur.

1) *Atlas*, Arbeit. d. pharmakol. Inst. zu Dorpat 1888, Bd. 1. — 2) *Gaisböck* und *Bayer*, Wien. klin. Wochenschr. 1924, Nr. 39. — 3) *Hausmann*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **6**, 567, 1915. — 4) *Jahnsom-Blohm*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 59, 1913. — 5) *Isaac* und *Moeckel*, Zeitschr. f. klin. Med. **72**, 1911. — 6) *Kagan*, Fol. hämatol. Arch. **17**, 210. 1914. — 7) *Kofler*, diese Zeitschr. **129**, Heft 1/2, 1922. — 8) *Derselbe*, Arch. d. Pharm. und Ber. d. deutsch. pharm. Ges. 1924, Heft 4. — 9) *Derselbe*, Pharm. Monatshefte 1922. — 10) *Derselbe*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrunsg- u. Genußmittel 1922, Nr. 13. — 11) *Kofler* und *Dafert*, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **33**, Heft 6/7, 1923. — 12) *Kofler*, *Kollert* und *Grill*, Wien. klin. Wochenschr. 1925, Nr. 13. — 13) *Lepeschkin*, nach Ref. Chem. Centralbl. **1924**, II, 1940. — 14) *Mercks* Jahresber., 34. Dezember 1923. — 15) *K. Meyer*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **11**, 257, 1908. — 16) *Neumayer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **59**, 311, 1908. — 17) *Pappenheim* und *Szécsi*, Fol. hämatol. Arch. **13**, 25, 1912. — 18) *Ransom*, Deutsch. med. Wochenschr. **27**, 194, 1901. — 19) *Riesenfeld* und *Lummerzheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**, 270, 1913. — 20) *Wada*, diese Zeitschr. **130**, 299, 1922. — 21) *Windaus*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **42**, 238, 1909. — 22) *Yagi*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **64**, 144, 1911.

Die Atropinhemmung und die Wirkung einiger organischer Säuren am Darm.

Von

L. Jendrassik und H. Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)
(Ausgeführt mit Unterstützung der Hilfsaktion des ungarischen Hochschulvereins.)

(Eingegangen am 10. April 1925.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Vermindert man die Kationkonzentrationen der Tyrodelösung, so treten am umspülten Kaninchendarm charakteristische vorübergehende Kontrakturen auf[1]). Es war von Interesse zu untersuchen, ob diese Kontrakturen denen der Pilocarpingruppe ähnlich sind oder einfache Muskelwirkungen darstellen. Diese Frage kann man mit Atropin entscheiden. Das Atropin hemmt bekanntlich die Kontrakturen der Pilocarpingruppe, Muskelwirkungen aber nicht.

Diese Versuche gaben Veranlassung, uns mit dem Atropin auch näher zu beschäftigen. Nämlich die Methode ist nur dann einwandfrei, wenn das Atropin selbst das fragliche Organ nicht beeinflußt. Sehr störend ist, wenn das Atropin auch allein im Sinne einer Vagushemmung wirkt. Um aus der Atropinhemmung Schlüsse ziehen zu können, ist jedenfalls die genaue Kenntnis seiner Eigenwirkung notwendig. In Versuchen am überlebenden Darm ist ganz besondere Vorsicht geboten, da die Eigenwirkung des Atropins hier nicht nur stark zutage tritt, sondern sich auch in verschiedenen Richtungen äußert.

Wir fanden, daß die Wirkung des Atropins am Darm auch von Bedingungen abhängt, die bisher nicht genügend bekannt bzw. berücksichtigt waren. Hierüber wollen wir zuerst unsere Erfahrungen

---

[1]) *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **148**, 116, 1924.

erwähnen. Im zweiten Teile dieses Aufsatzes werden wir dann zeigen, daß auf Grund einer richtigen Kenntnis der Eigenwirkung des Atropins die Natur mancher Kontrakturen im neuen Lichte erscheint.

Die Versuche sind an Kaninchen, zum Teil an Katzen angestellt. Unsere Methodik ist in dieser Zeitschrift **148**, 116 beschrieben. Die verwendete Tyrodelösung war ohne Mg und Phosphat hergestellt und hatte daher die Zusammensetzung: 0,8 Proz. NaCl, 0,02 Proz. KCl, 0,02 Proz. $CaCl_2$, 0,1 Proz. $NaHCO_3$, 0,1 Proz. Glucose. Wir überzeugten uns aber, daß die untersuchten Erscheinungen in Mg- und phosphathaltiger Lösung ebenso verlaufen. An den Abbildungen sind die Darmbewegungen ungefähr dreimal vergrößert.

I. Bezüglich der Eigenwirkung des Atropins müssen zwei Momente ins Auge gefaßt werden. Das eine ist bereits bekannt, aber nicht immer berücksichtigt. Das zweite, das in Versuchen am überlebenden Darm fast ebenso wichtig ist, soll weiter unten beschrieben werden.

1. Das Atropin kann den Darm sowohl hemmen, wie erregen, oft bleibt es aber ganz ohne Einfluß. In welchen Gaben das Atropin den Darm reizt bzw. lähmt, war eine seit langem bestehende Streitfrage, die erst vor einigen Jahren durch die *Magnus*sche Schule in interessanter Weise geklärt wurde[1]). *Wieland* hat in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Autoren nachgewiesen, daß aus dem Darm ein darmerregender Stoff in die umgebende Lösung diffundiert. *Le Heux* stellte fest, daß dieser Stoff Cholin ist. Als Hormon der Darmbewegung hält dieses die Amplituden bzw. den Tonus in bestimmter Höhe, und die Hemmung durch Atropin besteht eigentlich in der Ausschaltung der Cholinwirkung. Wird das Cholin zufolge einer langdauernden Umspülung aus der Darmwand ganz entfernt, so erhält man mit Atropin keine Hemmung mehr, in größeren Gaben tritt sogar seine erregende Eigenschaft zutage.

Dies ist für die Beurteilung der Atropinhemmung sehr wichtig. Auf Grund dieser Tatsachen ist es zu erwarten, daß am cholinhaltigen Darm Kontrakturen verschiedenster Natur durch Atropin mehr oder weniger gehemmt werden. Dies trifft auch tatsächlich zu. Die Abb. 1 und 2 zeigen je eine Barium- bzw. Kaliumkontraktur, die auf Atropin ganz verschwinden. Bekanntlich sind sowohl K wie Ba typische Muskelgifte. Das Atropin vermag, vor K oder Ba gegeben, ihre Kontrakturen nicht zu hemmen.

---

[1]) *R. Magnus*, Die Naturwissenschaften, 1922; *W. Wieland*, Pflügers Arch. **147**, 171, 1912; *I. W. Le Heux*, ebendaselbst **173**, 8, 1919; **179**, 177, 1920; **190**, 280, 300, 1921; *M. v. Kühlewein*, ebendaselbst **190**, 99, 1921; *K. Arai*, ebendaselbst **193**, 359, 1922; vgl. auch *K. Schübel*, Klin. Wochenschrift **3**, 687, 1924.

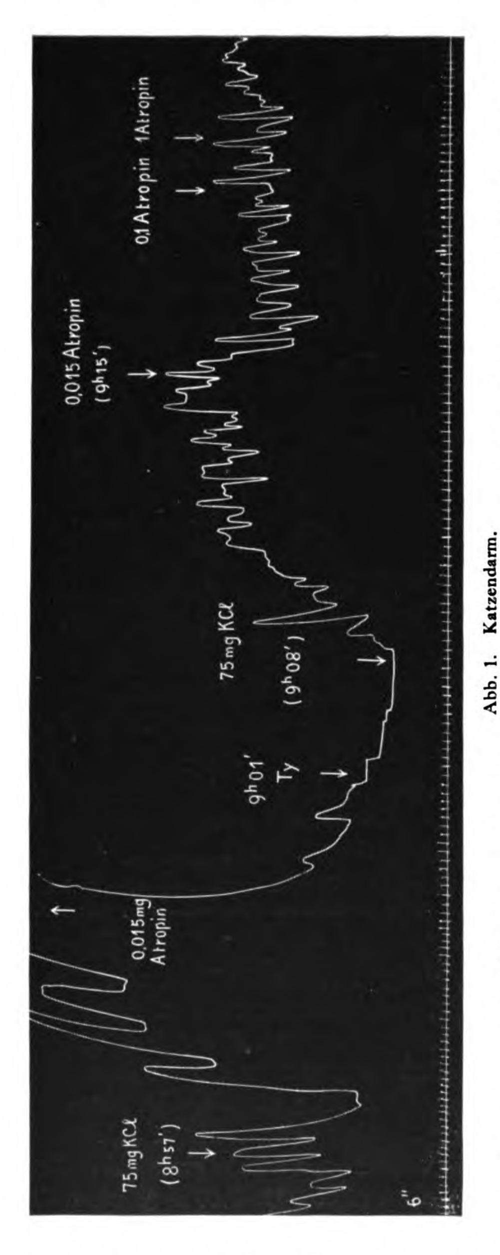


Abb. 1. Katzendarm.
(Versuch vom 25. VI. 1924.) Die erste Gabe KCl wird durch Atropin vollständig gehemmt, die zweite nur in geringem Grade.
(Die zweite Gabe verursacht auch eine schwächere Kontraktur.)

Es dürften hierbei noch folgende Einzelheiten bemerkt werden: Trotzdem das Atropin allein meistens bloß eine geringfügige Tonusverminderung hervorruft, kann es am kontrahierten Darme einen gewaltigen Sturz hervorbringen. Sogar bei einer starken Kaliumkontraktur kann das Atropin

den Tonus auf das ursprüngliche Niveau senken (Abb. 2). Bei starker Ba-Kontraktur ist diese Senkung minder ausgesprochen (Abb. 3a). Dies wäre verständlich, wenn eine Potenzierung zwischen K und Cholin bestehen würde, zwischen Ba und Cholin aber nicht. So müßte nämlich der Ausfall der Cholinwirkung auch die K-Kontraktur vermindern. Auffallend ist außerdem, daß die K-Kontrakturen durch Atropin (beim Kaninchen) nur für kurze Zeit aufgehoben werden, und der Tonus kehrt so bald wieder auf die ursprüngliche Höhe zurück.

2. Wir finden aber, daß es verfehlt wäre anzunehmen, daß man durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Cholin alle Unterschiede in der Atropinwirkung erklären könnte. Wäre die Art und Weise der

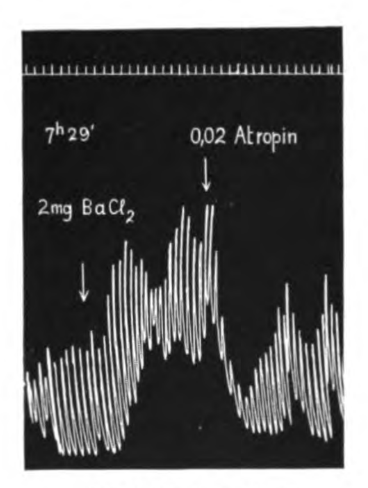


Abb. 2. Kaninchendarm.
(Versuch vom 10. XII. 1924.) Eine mittelstarke Bariumkontraktur wird durch Atropin fast vollständig gehemmt.

Atropinwirkung allein hierdurch bedingt, so müßte man in den ersten Stunden am isolierten Darm stets Hemmungen bekommen. Nach unseren Untersuchungen stimmt dies jedoch nicht immer zu. Wohl erzeugt die erste Atropingabe stets eine Hemmung; die weiteren Gaben können jedoch ohne Wirkung bleiben oder rufen (bei höheren Gaben) eine Vergrößerung der Bewegungen herbei (S. Abb. 5 und 6). Namentlich trifft dies ein, falls die erste Gabe groß war (0,1 bis 2 mg), oder auch nach kleineren Gaben (0,005 bis 0,05 mg), wenn der Darm nicht gut ausgewaschen war, besonders, wenn die Zeit zwischen den Gaben kurz (3 bis 5 Minuten) bemessen war. Mit einem Verlust des Cholins kann diese Erscheinung unmöglich erklärt werden, da das Cholin erst viel später aus dem Darm wegdiffundiert. Außerdem kehrt der Darm nach zwei- bis dreimaligem Auswaschen in seinen früheren Zustand

zurück, wo durch eine neuerliche Gabe wieder eine Hemmung erzeugt werden kann.

Hieraus ist es höchst wahrscheinlich, daß die Umstimmung des Darms durch das zurückgehaltene und noch nicht vollkommen herausdiffundierte Atropin verursacht wird. Enthält daher der Darm noch etwas Atropin, so vermag man mit neuerlichen Atropingaben keine Hemmung zu erzielen. Hiermit dürfte wohl auch erklärt werden, warum einige Autoren, bevor noch die Anwesenheit von Cholin im Darm bekannt war, die hemmende Wirkung kleiner Atropingaben leugneten. Die Hemmung ist aber stets nachweisbar, falls der Darm mit Atropin vorher noch nicht behandelt war oder daraus die Spuren vorangegangener Gaben entfernt worden sind. Diese Erscheinung ist recht gut verständlich, wenn man bedenkt, daß die Atropinhemmung in einer Ausschaltung der Cholinwirkung besteht. Da zur Aufhebung der gesamten Cholinwirkung bereits ganz kleine Atropingaben hinreichen, vermögen weitere Gaben selbstverständlich keine weitere Hemmung zu verursachen.

Beim Arbeiten mit Atropin müssen diese Verhältnisse stets vor Augen gehalten werden. Waschen wir nämlich das Atropin aus dem Darm nicht vollständig aus, und rufen weitere Gaben keine Hemmung hervor, so ist es noch immer möglich, daß die erste Gabe auf dem Wege einer Cholinhemmung wirkte.

Die Erscheinung verdient aber die Aufmerksamkeit auch dadurch, daß es sich hierbei um einen interessanten Fall der akuten pharmakologischen Gewöhnung handelt. Diese wird hier einfach durch die Zurückhaltung kleiner Mengen des Mittels bedingt, und zwar dadurch, daß die Wirkung eines im Organ enthaltenen Stoffes, des Cholins, paralysiert. Endlich ist diese Gewöhnung auch deshalb interessant, weil die Anwesenheit von Atropin an dem Bewegungszustand des Darmes oft entweder überhaupt nicht, oder doch nur kaum zu erkennen ist. Man kann nämlich feststellen, daß die Bewegungen auf Atropin anfänglich stark abnehmen, manchmal selbst ganz aufhören, nachher werden sie aber allmählich höher. Meistens erreichen sie die ursprünglichen Amplituden nicht. Nur in einem kleineren Teile der Fälle kehren sie zur ursprünglichen Höhe zurück (wäscht man das Organ in 12 bis 15 Minuten drei- bis viermal mit neuer Lösung aus und entfernt somit das Atropin, so kehren die Amplituden immer zurück). Es fragt sich nun, wie das Verschwinden der Atropinwirkung zustande kommt. Es ist möglich, daß auch beim Atropin die Aufhäufung (Konzentrationszunahme) stärker wirkt als die Anwesenheit des Giftes. Wir hatten daher mit einer „Augmentationswirkung" zu tun[1]). Wir glauben, daß wenigstens zum Teil auch dieser Mechanismus im Spiele ist. Die Atropinwirkung gehört daher in die Kategorie der vorübergehenden oder teils vorübergehenden Wirkungen. Es kann auch sein, daß der Ausfall der Cholinwirkung die Erscheinung verursacht. Beim Auswaschen von Cholingaben, die Kontraktur erzeugten, sehen wir oft eine vorübergehende

[1]) Vgl. *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **148**, 116, 1924; *L. Jendrassik* und *E. Moser*, ebendaselbst **152**, 94, 1924.

Senkung des Tonus unterhalb des ursprünglichen Niveaus. Es ist aber auch die Möglichkeit ins Auge zu fassen, daß das Atropin am Darme „manent" wirkt, jedoch allmählich so viel Atropin sich anhäuft, daß seine erregende Wirkung immer mehr in den Vordergrund tritt. So würde das Atropin die Rolle des Cholins übernehmen. Nur unter Zuhilfenahme der letzteren Erklärungsweise ist es zu verstehen, warum nach Zusatz frischer Tyrodelösung zum Darme die neuerliche Atropingabe (wenigstens vorübergehend) die Bewegungen minder stark senkt als die erste Gabe. Es ist somit in der Atropingewöhnung des Darmes auffallend, daß im Bewegungszustand des Darmes gewöhnlich kleinere Veränderungen zurückbleiben, als das Verständnis der Wirkungslosigkeit neuerlicher Gaben erheischt. In einem Versuch (Abb. 6) haben 0,04 mg Atropin eine vorübergehende Wirkung entfaltet. Später nach dem Auswaschen war dieselbe Gabe ohne jede Wirkung, obgleich die Amplituden der Bewegungen keineswegs kleiner waren als anfänglich.

Ungewöhnlich ist diese Erscheinung auch insofern, als kleine zurückgehaltene Mengen des Giftes die Wirkung fernerer Giftdosen herabsetzen. Bei anderen Alkaloiden, beispielsweise beim Pilocarpin, beobachtet man gerade das Entgegengesetzte; nach dem Auswaschen der ersten Gabe verursacht dieselbe Menge eine größere Kontraktur als die erste und eine dritte Gabe eine noch größere als die zweite. Auch diese Erscheinung pflegt man damit zu erklären, daß vom Darme kleine Pilocarpinmengen zurückgehalten werden[1]). Auffallend ist daher, daß beim Atropin die zurückgehaltenen Giftmengen die Wirkung weiterer Gaben in entgegengesetzter Richtung beeinflussen.

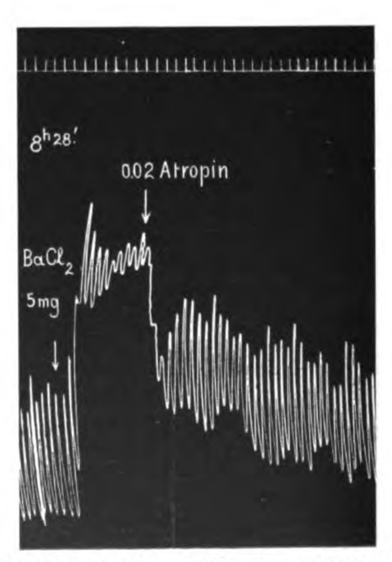


Abb. 3a. Kaninchendarm. (Versuch vom 10. XII. 1924.)
Die erste Bariumkontraktur wird durch Atropin beträchtlich gesenkt. Nach einmaligem Auswaschen wird der Versuch wiederholt: Atropin ist fast unwirksam.

[1]) *W. Storm van Leeuwen* und *v. d. Broeke*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 88, 1920.

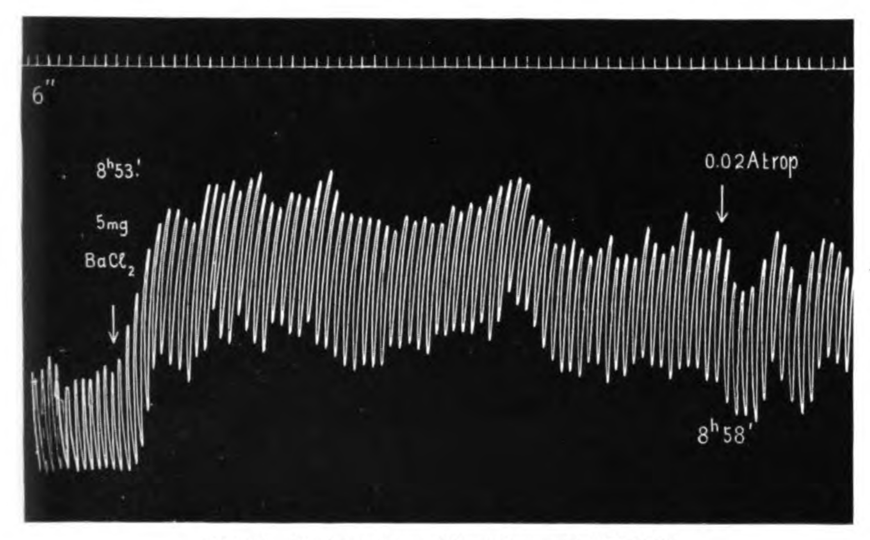


Abb. 3b. Kaninchendarm. (Versuch vom 10. XII. 1924.)
Die erste Bariumkontraktur wird durch Atropin beträchtlich gesenkt. Nach einmaligem Auswaschen wird der Versuch wiederholt: Atropin ist fast unwirksam.

Die Gewöhnung gegenüber Atropin ist auch bei Kontrakturhemmungen merksam. Wird die Wirkung eines muskelreizenden Stoffes beim ersten Versuch beträchtlich verringert, so ist dieser Einfluß des Atropins beim Wiederholen des Versuches (nach Auswaschen des Darmes) kleiner oder bleibt auch vollständig aus (vgl. die Abb. 3a und 3b).

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß eine durch Atropin hemmbare Kontraktur nur dann auf pilocarpinartige Reizung zurückgeführt

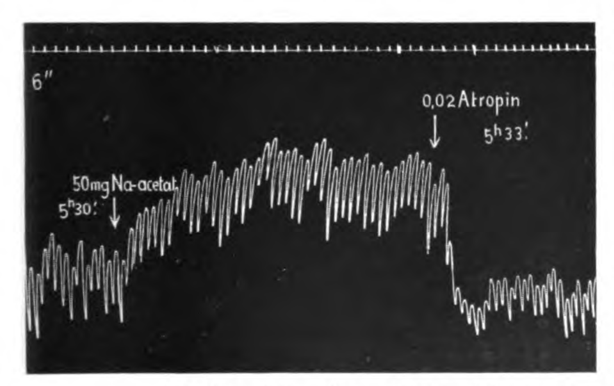




Abb. 4a und 4b. Kaninchendarm. (Versuch vom 17. IV. 1924.)
Kontraktur durch Natriumacetat wird durch nachträglich verabreichtes Atropin vollständig gehemmt. Nach einmaligem Auswaschen hat dieselbe Gabe Atropin keine Wirkung.

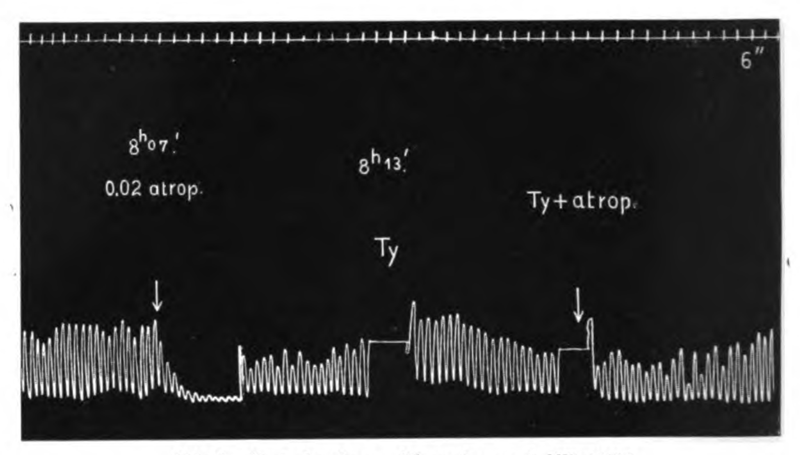


Abb. 5. Kaninchendarm. (Versuch vom 2. VII. 1924.)
Starke, zum Teil vorübergehende Wirkung durch Atropin. Die Atropin enthaltende Tyrodelösung wird bei Ty entfernt, aufgefangen und mit frischer Lösung ersetzt. — Bei Ty + Atropin wird die Atropin enthaltende Flüssigkeit von Neuem gegeben. Sie hat keine Wirkung mehr.

werden darf, falls der Darm kein Cholin mehr enthält. Stets darf aber die präventive Wirkung vorher gegebenen Atropins als beweisend betrachtet werden. Dagegen darf die Kontraktur auf eine vagusartige Wirkung nicht bezogen werden in Fällen, wo die Hemmung durch nachher gegebenes Atropin nur unvollständig ist und das Niveau nicht auf die ursprüngliche Höhe herabsinkt.

II. Bei der Untersuchung von Darmkontrakturen werden die erwähnten Verhältnisse nicht von allen Beobachtern berücksichtigt wie wir dies weiter unten noch besprechen werden. In diesen Fehler ist auch einer von uns[1]) verfallen, als er den Einfluß eines mit Ringer-Lockelösung hergestellten Kaninchenvorhofextrakts auf in Tyrodelösung gehaltenen Darm untersuchte. Größere Gaben dieses Extrakts rufen am Darm Kontrakturen hervor. Da nachträglich verabreichtes Atropin diese Kontraktur vollständig antagonisieren kann, bezog er die Wirkung auf eine Vaguserregung. Nach einmaligem Auswaschen verabreichte zweite Gabe Atropin erzeugte in diesen Versuchen keine Hemmung, sogar eine Verstärkung der Bewegungen.

Es wurde dieser Versuch seither in zahlreichen Fällen wiederholt und es zeigte sich die Kontrakturhemmung nicht immer vollständig. Versetzt man den Darm nach der ersten Atropingabe nur einmal mit frischer Lösung, so entsteht nach Zufügung des Extrakts wohl eine Kontraktur, sie wird jedoch durch Atropin entweder überhaupt nicht

[1]) *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **144**, 520, 1924.

oder nur wenig verringert. Auf Grund dieser Erfahrung darf die darmerregende Wirkung des Vorhofextraktes nicht mit Anwesenheit eines pilocarpinähnlich wirkenden Stoffes erklärt werden. Wird eine Kontraktur durch nachher gegebenes Atropin gehemmt, und ergibt nach Auswaschen des Darmes dieselbe Dosis Atropin (als Kontrolle gegeben) keine Wirkung, so beweist dies noch durchaus nicht, daß der Darm schon kein wirksames Cholin mehr enthält (darum wäre die Wirkung im Kontrollversuch ausgeblieben), und daß der kontrakturerzeugende Stoff dem Pilocarpin ähnlich wirkt. Es ist ebenso möglich, daß im ersten Versuch nur der durch Cholin aufrechterhaltene Teil des Tonus aufgehoben wird; im Kontrollversuch ist das Atropin unwirksam, weil der Darm ihm gegenüber unempfindlich geworden ist. Im Versuch der Abb. 4a und 4b ist letzteres der Fall. Der obengenannte Fehler findet seine Entschuldigung darin, daß diese Wirkungen des Atropins noch nicht vollständig bekannt waren. Auch in Arbeiten der Utrechter Schule wird die Hemmung durch nachträglich gegebenes Atropin als Beweis für die cholinartige Wirkung gedeutet[1]).

Le Heux, dem wir den Nachweis des Cholins im Darme verdanken, erklärte auch die erregende Wirkung gewisser organischer Salze auf den Darm mit der Anwesenheit von Cholin. Seiner Meinung nach rufen Natriumacetat, -Propionat, -Butyrat und -Pyruvinat ihre Wirkung dadurch hervor, daß aus ihnen unter dem Einfluß eines gewissen Ferments Cholinester erstehen und dadurch die Wirkung des vorhandenen Cholins wesentlich erhöhen. Aus den Arbeiten von *Reid Hunt* und *Taveau*[2]) ist es bekannt, daß gewisse Ester des Cholins in demselben Sinne, jedoch bedeutend stärker wirken als Cholin selbst. Nach *Le Heux* wirkt z. B. Acetylcholin auf Kaninchendarm 500- bis 1000fach stärker. Der Mechanismus dieser Wirkung ist in der Pharmakologie insofern prinzipiell neu, als hier die verabreichte Substanz vorerst mit einem Hormon in den Geweben sich chemisch verbindet und erst das entstandene Produkt die sichtbare Wirkung verursacht.

Unter den Beweisen, die *Le Heux* zur Stützung seiner Auffassung heranzieht, wird auch angeführt, daß das nachträglich gegebene Atropin die Wirkung dieser Salze hemmt. Dies entspricht der Hypothese, da die Cholinester alle durch Atropin antagonisierbare Gifte sind.

[1]) Interessant ist, daß in der Fußnote einer früheren Arbeit von *E. L. Bachmann* aus demselben Institute (Pflügers Arch. **189**, 261, 1921) schon der Hinweis gemacht wird, daß wegen Eigenwirkung des Atropins eine nachträgliche Hemmung nicht beweisend ist.

[2]) *Reid Hunt and R. de M. Taveau*, zitiert nach *Le Heux*, Pflügers Arch. **173**, 12, 1918.

Da auch aus anderen Gründen diese Auffassung der Acetatwirkung uns nicht sehr wahrscheinlich schien, wiederholten wir diese Versuche. Wir untersuchten vor allem, ob vorher gegebenes Atropin die Acetatwirkung zu verhindern imstande ist. 50 bis 200 mg kristallinisches Na-Acetat verursacht in der verwendete glykosehaltige Tyrodelösung nach kurzer Lähmung von 10 bis 30 Sekunden (dies kommt nicht immer zustande) eine Verstärkung der Bewegungen, oft auch eine niedrige Kontraktur. Die Kontraktur ist häufig von vorübergehender Natur, die Verstärkung der Bewegungen hält dagegen länger (2 Minuten oder auch manent) an. Nach dem Auswaschen des Salzes (wo die acetathaltige Lösung durch frische Tyrodelösung ersetzt wird) läßt sich nichts Besonderes wahrnehmen; der ursprüngliche Bewegungszustand kehrt sobald zurück. Auch größere Gaben erzeugen keine stärkere Kontraktur. Dies vermag darin seine Erklärung finden, daß durch viel ($Na^{\cdot}$) die Amplituden verringert werden. Die anfänglich

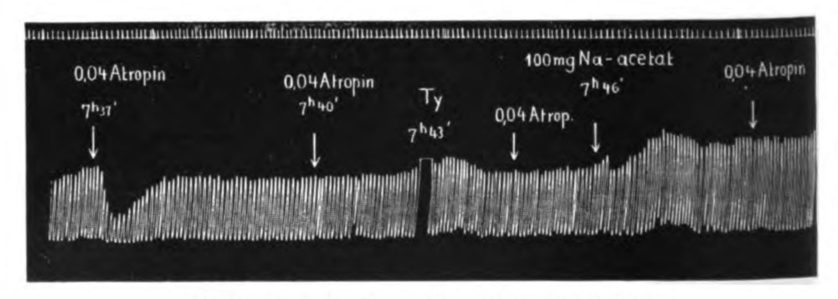


Abb. 6. Kaninchendarm. (Versuch vom 19. XII. 1924.)
Vorübergehende Wirkung durch Atropin, zweite Gabe unwirksam. — Bei Ty frische Lösung. Na-Acetat ist auch nach Atropin wirksam und wird jetzt auch durch nachträglich gegebenes Atropin nicht gehindert.

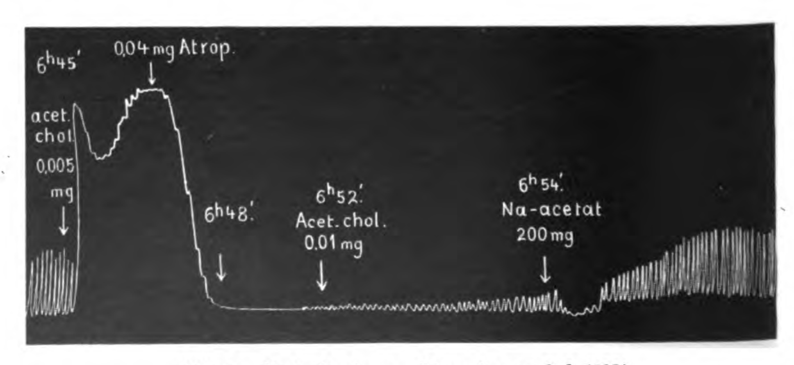


Abb. 7. Kaninchendarm. (Versuch vom 2. I. 1925.)
Mittelstarke Kontraktur von Acetylcholin wird durch Atropin vollständig gehemmt. Neue Gabe von Acetylcholin unwirksam. (Die schwachen Bewegungen würden auch ohne Acetylcholin erscheinen.) Na-Acetat unwirksam.

zur Beobachtung gelangte flüchtige Lähmung, deren Zustandekommen *Le Heux* nicht erklärt, kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, daß die Essigsäure, die als hydrolytisches Spaltprodukt des Salzes vorhanden ist, früher in die Muskelschicht eindringt als das NaOH und hier als säurewirkend eine Lähmung hervorruft.

Die erregende Wirkung des Na-Acetats wird durch nachträglich verabfolgtes Atropin verringert, wie dies auch *Le Heux* beobachtete. Freilich kann man hieraus nicht erfahren, wieweit dies durch die Beeinflussung der Acetatwirkung und wieweit durch die Beeinflussung der Cholinwirkung bedingt ist. Gibt man dagegen zum Darm vorher z. B. 0,04 mg Atropinsulfat und nachher das Acetat, so kommt die Wirkung ebenfalls zutage. Das nachher in ebensolcher Menge gegebene Atropin bleibt wirkungslos, zum Zeichen, daß es die durch Na-Acetat hervorgerufene Engung nicht zu hemmen vermag.

Dieser Umstand schließt die Möglichkeit aus, daß die Wirkung auf dem Entstehen von Acetylcholin beruhe. Selbst sehr große Gaben von Acetylcholin wirken nicht nach vorheriger Verabfolgung von Atropin. In dem Versuch der Abb. 7 hat Acetylcholin (das ungefähr 0,005 mg Cholin entsprach), das aus Cholin und Acetylchlorid hergestellt worden war, eine mittelstarke Kontraktur erzeugt, die bedeutend stärker war, als man sie durch beliebig große Na-Acetatgaben hervorzurufen vermag. Nachher versetzten wir den Darm mit 0,04 mg Atropin, hierauf das Zweifache der vorher gegebenen Acetylcholinmenge (also ungefähr 0,01 mg) und selbst diese konnte nicht die Mischung des Atropins durchbrechen. Na-Acetat (200 mg) hat jedoch auch hiernach gewirkt.

In glykosefreier Lösung entstehen die Wirkungen ganz ähnlich, nur bekommt man da bereits mit 20 bis 50 mg Na-Acetat wahrnehmbare Wirkungen. Dies entspricht den Erfahrungen von *Le Heux*, wonach die Empfindlichkeit des Darmes in solchen Lösungen diesen Salzen gegenüber erhöht ist. Vorher gegebenes Atropin hemmt auch hier genau so.

Mit Na-Propionat, Na-Formiat und Na-Butyrat verhält es sich ebenso wie mit Na-Acetat. Nach Atropin gegeben, wirken sie vollständig ungestört.

Mit freier Essigsäure (25 mg) oder Propionsäure (25 mg) erhält man bedeutende (mittelhohe) Darmkontrakturen. Dieselben sind viel ausgeprägter, als man sie mit irgendwelcher Gabe von Salzen erzeugen kann. Nach *Le Heux'* Auffassung könnte man dies damit erklären, daß im weniger alkalischen Medium die Estersynthese leichter vonstatten geht. Das Fehlen einer hemmenden Wirkung des vorher gegebenen Atropins läßt jedoch diese Erklärung nicht aufrechterhalten. Da die verursachten Kontrakturen hier größer sind, ist die Unwirksamkeit des Atropins hier sogar viel auffallender.

Es ergibt sich noch die Frage, warum die freie Säure stärker wirkt als das Salz. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß die mehr saure Reaktion daran schuld trägt, vielleicht dadurch, daß die Kontrakturen durch das Essigsäuremolekül verursacht werden. In der Na-Acetat enthaltenden Lösung wäre folglich nur die bei der Hydrolyse entstehende Essigsäure wirksam. Es wäre dann verständlich, daß die freie Säure (von der die verwendete Menge von 25 mg das p_H der Tyrodelösung von 7,7 auf 7,0 herabsetzte) mehr Essigsäuremoleküle liefert und daher eine intensivere Wirkung entfaltet. Gegen diese Erklärung spricht jedoch, daß Ansäuern mit HCl die Wirkung von Acetat nicht verstärkt. Fügt man zur Acetatlösung so viel HCl hinzu, daß das p_H ebenfalls 7,0 beträgt (Bestimmung mit einfarbigen Indikatoren nach *Michaelis*), so gewinnt hierdurch die Wirkung des Na-Acetats nicht, ja sie pflegt weniger ausgesprochen zu sein als die von Na-Acetat allein. Die Tatsachen sprechen also gegen die obige Erklärung. Jedenfalls verringert aber die Wirkung des Na-Acetats gegenüber der freien Essigsäure der Umstand, daß damit auch die ($Na^{\cdot}$) der Lösung gesteigert werden, wodurch, wie bereits erwähnt, die Amplituden sich verkleinern. Dieser Umstand spielt sicherlich eine Rolle. Möglich ist auch, daß die Verunreinigungen, die in den freien Säuren stets vorkommen, eine stärkere Wirkung als Essigsäure haben.

Die erwähnten Versuche beweisen, daß die erregende Wirkung der untersuchten organischen Säuren und Salze auf den Darm durch Atropin nicht zu hemmen sind. Ihre Wirkung beruht daher hauptsächlich nicht auf Bildung von Cholinestern. Findet das trotzdem statt, so ist es für die Wirkung sicher von ganz untergeordneter Bedeutung. Die Wirkung ist am atropinisierten Darme fast ebenso stark wie am normalen. Die kleine Differenz spricht aber auch nicht dafür, daß dabei ein parasympathisches Gift mitspielt. Atropin kann auch die Höhe von Ionkontrakturen verringern. So ist die Höhe einer Kaliumkontraktur nach Atropin oft kleiner als vorher (vgl. Abb. 2).

Auch andere Umstände lassen sich gegen die Erklärungsweise von *Le Heux* anführen. So wirkt nach *Rona* und *Neukirch*[1]) Na-Pyruvinat auch auf das Herz, und zwar auch hier in positiv inotroper Richtung. Dies entspricht vollkommen dem Muskelgiftcharakter dieser Säure, widerspricht jedoch der Erklärung von *Le Heux*, da am Herzen die Cholinester negativ inotrop (oder chomotrop) wirken. Hat die Brenztraubensäure am Herzen eine solche Wirkung, so ist es zu erwarten, daß sie auch am Darme ähnlicherweise zu wirken imstande ist. Auch sonst wäre es eigentümlich, wie eine Enzymreaktion, die zur Esterbildung führt, bereits in einigen Augenblicken zum Gleichgewichtszustand gelangen könnte. Die Kontraktur vergrößert sich nämlich mit der Zeit gewöhnlich nicht mehr, gleich am Anfang innerhalb ½ bis 1½ Minuten erhält man das maximale Niveau, später pflegt sich sogar eher eine Erniedrigung einzustellen. Könnte man im Darme alles Cholin zu Acetylester umwandeln, so müßte man Kontrakturen von maximaler Stärke erhalten. Solche müßte man auch beobachten, wenn die ganze Menge des verabreichten Acetats zu Ester sich verwandelte. Man könnte die Esterbildung nur auf die Weise vorstellen, daß das Reaktionsgleichgewicht nur die Existenz von ganz kleinen Estermengen zuließe und dieses Gleichgewicht bereits am Anfang der Wirkung erreicht wird.

[1]) *P. Neukirch* und *P. Rona*, Pflügers Arch. **148**, 285, 1912.

Bei Fermentreaktionen pflegt sich jedoch der Gleichgewichtszustand keineswegs in so kurzer Zeit anzunähern.

Auch ein anderer Beweis von *Le Heux* ist nicht vollwertig. Er gibt an, daß an stark gewaschenen Därmen, wo das Atropin schon unwirksam ist, auch die untersuchten Salze nicht wirken. Er erwähnt aber in seiner Arbeit nur, daß Gaben, die anfänglich wirksam waren, nach dem Auswaschen von keinem Einfluß sind, untersuchte aber nicht, ob größere Gaben eine Wirkung haben. Für seine Ansicht wäre nur beweisend, wenn auch große Gaben wirkungslos wären. So ist recht möglich, daß beim Auswaschen der Darm in hypodynamen Zustand gerät und seine Empfindlichkeit gegen bestimmte chemische Agenzien kleiner wird. Wenn die Waschflüssigkeit die ursprüngliche Reaktionsfähigkeit dem Darme zurückzugeben vermag, so ist das auch nicht ohne weiteres seinem Cholin- und Fermentgehalt zuzuschreiben. Hierfür könnten einfach die ausgewaschenen „Lipoide" verantwortlich sein, ähnlich wie in den Versuchen von *Clark*[1]).

Als unsere Arbeit bereits abgeschlossen war, wurden uns die neuen Ergebnisse der *Abderhalden*schen Schule bekannt. *Abderhalden, Paffrath* und *Sickel* lassen zwar die Möglichkeit der Esterbildung zu, urteilen aber bezgl. dieser Versuche ähnlicherweise[2]).

Zusammenfassung.

1. Die Hemmung von Darmkontrakturen durch nachträglich verabfolgtes Atropin beweist keineswegs, daß die Kontraktur der Pilocarpinwirkung ähnlich ist. Auch die Eigenwirkung des Atropins kann eine Tonussenkung zustande bringen. Kleinere Barium- und Kaliumkontrakturen können mit Hilfe von Atropin vollständig gehemmt werden.

2. Die Wirkung kleinerer Gaben von Atropin ist zum Teil oder ganz vorübergehender Natur. Nach unvollkommenem Auswaschen wirken neuerliche Atropingaben nicht, wenn auch der Bewegungszustand des Darmes zum ursprünglichen Zustand zurückgekehrt ist. Nur nach wiederholtem Auswaschen erlangt der Darm seine normale Empfindlichkeit gegenüber Atropin wieder. Die Gewöhnung wird wahrscheinlich durch kleine zurückgehaltene Mengen des Giftes verursacht.

3. Wird eine Kontraktur durch nachträglich verabreichtes Atropin beim Wiederholen des Versuchs nicht vollständig zum Schwinden gebracht, so spricht dies gegen eine pilocarpinähnliche Wirkung.

[1]) *A. J. Clark*, Journ. of Physiol. 54, 275, 1920.

[2]) *E. Abderhalden, H. Paffrath* und *H. Sickel*, Pflügers Arch. 204, 246, 1925.

4. Unter Zuhilfenahme von Atropin läßt sich nachweisen. daß die Wirkung von Na-Acetat, Na-Propionat und Na-Pyruvinat nicht durch das Entstehen von Cholinester bedingt ist. Ihre Wirkung tritt nämlich auch nach vorheriger Behandlung des Darmes mit Atropin zutage, während Acetylcholin in solchen Fällen, selbst in großen Gaben, unwirksam ist. Freie Essigsäure und Propionsäure wirken stärker als ihre Salze. Dies wird aber nicht durch das höhere C_H verursacht. Auch die Wirkung der freien Säuren wird durch Atropin nicht gehemmt.

Über den Glykogen- und Cerebrosidstoffwechsel des Zentralnervensystems.

Von

Hans Winterstein und **Else Hirschberg.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 11. April 1925.)

In früheren Untersuchungen hatten wir festgestellt[1]), daß das isolierte Froschrückenmark Zucker der umgebenden Lösung umsetzt, und zwar je nach den Lebensbedingungen und je nach der angewandten Zuckerart in sehr verschiedenem Ausmaße. Durch die im folgenden mitgeteilten Versuche soll das Schicksal der in Zentren selbst enthaltenen Zuckerstoffe, des *Glykogens* und der *Cerebroside*, unter verschiedenen Bedingungen verfolgt werden.

Nach Abschluß des größten Teiles unserer Versuche erschien aus dem *Asher*schen Institut eine Arbeit von *Takahashi*[2]) über den Kohlenhydratstoffwechsel des Gehirns von Warmblütern. Wir werden auf diese Untersuchungen, die unseres Wissens die ersten sind, in denen die Veränderungen des Gehalts an Zuckerstoffen im Zentralnervensystem studiert wurden, noch mehrfach zurückkommen.

A. Methodik.

Zur Bestimmung des Glykogens diente das *Pflüger*sche Verfahren in der von *de Haan*[3]) bei Leucocyten angewandten Modifikation als Mikromethode, die unseren Bedürfnissen entsprechend etwas abgeändert wurde: Die zu untersuchenden Teile des Nervensystems wurden in 2 ccm 15proz. KOH 2 Stunden zerkocht, dann mit 4 ccm 96proz. Alkohol versetzt; nach mehrstündigem Absetzenlassen des Niederschlages wurde abzentrifugiert, die alkoholische KOH abgegossen, der Niederschlag erst mit 66proz. Alkohol, dann mit absolutem Alkohol, Äther und nochmals mit absolutem Alkohol unter jedesmaligem Abzentrifugieren gewaschen und der zurückbleibende Rest des Alkohols abgedampft. Zur Inversion des so

---

[1]) *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 185, 1917; **101**, 248, 1918.

[2]) *L. Asher* und *K. Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 444, 1924.

[3]) *J. de Haan*, ebenda **128**, 124, 1922.

gewonnenen Rückstandes wurde ursprünglich entsprechend der (auch von *de Haan* befolgten) Vorschrift *Pflügers* mit 2,2proz. HCl 3 bis 4 Stunden gekocht. Die Angabe *Pflügers*[1]), daß dies die für die Inversion am besten geeignete Anordnung sei, stützt sich auf die in seinem Institut ausgeführten Versuche von *Nerking*[2]), der aber die Wirkung höherer HCl-Konzentrationen nicht untersucht zu haben scheint. Wir haben zur Abkürzung dieses Verfahrens eine Reihe von Bestimmungen ausgeführt und gefunden, daß halbstündiges Kochen mit etwa 11proz. HCl die besten Resultate lieferte. In der Folge wurde daher stets diese Modifikation der Methode angewendet. Der beim Kochen zurückbleibende Rest wird abfiltriert und mit einer kleinen Menge Wasser nachgewaschen.

Die Bestimmung des invertierten Zuckers erfolgte nach dem Verfahren von *Bertrand* in der von *Greiner*[3]) empfohlenen Modifikation, die außer den von *Bertrand* vorgeschriebenen Lösungen noch eine solche von Na_2CO_3 und $NaHCO_3$ zur Bildung von $CuCO_3$ verwendet. Die von uns benutzten Mengen waren geringer als bei *Greiner:* Zu der mit NaOH neutralisierten invertierten Lösung wurden je 3 ccm der Kupfer-, Carbonat- und Seignettesalzlösungen (Zusammensetzung s. bei *Greiner*) zugesetzt, 3 Minuten gekocht, abgekühlt, der Niederschlag gewaschen, mit 3 ccm Eisensulfatlösung versetzt und aus einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten Mikrobürette mit n/100 Kaliumpermanganat titriert. In dieser Form erwies sich die Methode auch für Mengen von weniger als 1 mg gut brauchbar. In Ergänzung der bei *Greiner* angeführten, von 10 bis 1 mg Zucker reichenden Tabelle geben wir im folgenden die Cu-Werte von 1 bis 0,25 mg; die Zwischenwerte wurden durch Interpolation, noch kleinere gegebenenfalls durch Extrapolation berechnet.

Es entsprechen:

1 mg	Glucose	2,29 mg Cu
0,5 „	„	1,28 „ „
0,25 „	„	0,70 „ „

Die so ermittelten Zuckerwerte haben wir, dem Beispiel *de Haans* folgend, ohne weiteres dem Glykogen gleichgesetzt, mit Rücksicht darauf, daß die der Formel nach zu berechnende Verminderung durch die Unvollständigkeit der Inversion ungefähr ausgeglichen wird.

Bei dem eben geschilderten Verfahren der Glykogenbestimmung hatten wir zunächst nicht berücksichtigt, daß durch den kalten Alkohol außer dem Glykogen auch noch Cerebroside gefällt werden bzw. ungelöst in ihm zurückbleiben können, die beim Kochen mit HCl durch Abspaltung von Galaktose den Reduktionswert zu erhöhen vermögen. Bei den Leucocyten, bei denen dieser Umstand auch von *de Haan* nicht beachtet wurde, mag er vielleicht nicht in Betracht kommen, beim Zentralnervensystem aber spielt er, wie wir gleich sehen werden, eine merkliche Rolle. Die zuerst ausgeführten Bestimmungen und Versuche betreffen also den Gesamtgehalt an in kaltem Alkohol unlöslichen Substanzen, die beim Kochen mit Salzsäure reduzierende Stoffe liefern. In der alkoholischen KOH waren keine reduzierenden Substanzen nachweisbar.

Zur *Sonderung des Glykogens von den Cerebrosiden* standen zwei Wege offen: Entweder konnten die letzteren vor Ausführung der Glykogen-

---

[1]) *E. Pflüger*, Das Glykogen, 2. Aufl., 1905, S. 27.
[2]) *J. Nerking*, Pflügers Arch. **85**, 320, 1901.
[3]) *J. Greiner*, diese Zeitschr. **128**, 274, 1922.

bestimmung extrahiert oder das mit Alkohol gefällte Glykogen durch Auflösung in Wasser von den übrigen Stoffen abgetrennt werden. Beide Wege wurden in der Folge betreten.

Zur Extraktion erwies sich siedender Alkohol am besten geeignet, weil die übrigen Extraktionsmittel (Aceton, Petroläther und vor allem Chloroform, auch wenn es sich um reinstes, zur Narkose dienendes handelte) selbst einen reduzierenden Rückstand beim Abdestillieren ergaben, der bei den winzigen Mengen, um die es sich hier handelte, die Genauigkeit der Bestimmung stark beeinträchtigte. Es wurde daher bei den Extraktionsversuchen später ausschließlich so verfahren, daß das betreffende Organstück erst 1 Stunde in kochendem Alkohol extrahiert wurde; eine Verlängerung der Kochzeit darüber hinaus schien keinen nennenswerten Einfluß zu haben. Dann wurde noch heiß durch ein *Schott*sches gesintertes Glasfilter filtriert und in dem Rückstand das Glykogen in der gewöhnlichen Weise bestimmt. Im Filtrat wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit Salzsäure gekocht und der abgespaltene Zucker gleichfalls nach *Bertrand* bestimmt.

Bei dem zweiten, in den späteren Versuchen ausschließlich verwendeten Verfahren der Abtrennung des Glykogens aus der Alkoholfällung wurde so vorgegangen, daß diese nach Abzentrifugieren mit siedendem Wasser aufgenommen, wieder zentrifugiert und die wässerige Lösung abgegossen wurde. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurde zu dem zusammengegossenen wässerigen Extrakt so viel HCl zugesetzt, daß er 11 Proz. enthielt, und die weitere Bestimmung in der gewöhnlichen Weise ausgeführt, oder es wurde nochmals mit Alkohol gefällt und erst die Fällung mit HCl invertiert. Ein Kontrollversuch an demselben Präparat ergab in beiden Fällen das gleiche Resultat. In dem Rückstand der wässerigen Extraktion, der die Cerebroside enthielt, wurde der Reduktionswert nach Kochen mit HCl gleichfalls wie sonst festgestellt. Inwieweit mit diesen Methoden eine wirklich vollständige Bestimmung des ganzen Cerebrosidzuckers erfolgt, entzieht sich unserer Kenntnis; für die Vergleichung des Cerebrosidgehaltes unter verschiedenen Bedingungen erscheint sie jedenfalls anwendbar.

Die Versuche sind sämtlich an dem isolierten Zentralnervensystem von Rana esculenta ausgeführt, und zwar in zwei Versuchsreihen: Die erste in den Monaten Februar bis August 1924. Im Sommer war der Glykogengehalt so gering geworden (s. unten), daß die Nachprüfung der überraschenden Ergebnisse der Reizversuche auf den Herbst verschoben werden mußte. Diese zweite Reihe von Versuchen wurde in den Monaten November und Dezember 1924 und Januar bis März 1925 angestellt.

B. Versuchsergebnisse.

Vorausgeschickt muß werden, daß der von uns gefundene Glykogengehalt, wenigstens in der kühlen Jahreszeit, sehr viel größer war als sich nach den bisher vorliegenden Angaben vermuten ließ. Haben doch *Thudichum*[1]) und andere im menschlichen Gehirn überhaupt kein Glykogen gefunden und ebensowenig gelang es *Barfurth*[2]) und

[1]) *J. L. W. Thudichum*, Die chemische Konstitution des Gehirns. Tübingen 1901.

[2]) *D. Barfurth*, Arch. f. mikrosk. Anat. **25**, 269, 1885.

einigen anderen Forschern mikroskopisch solches im Gehirn verschiedener Tiere, darunter auch der Frösche, nachzuweisen. Es ist jedoch zu bemerken, daß menschliche Gehirne ja immer erst längere Zeit nach dem Tode zur Untersuchung gelangen, wenn das vorhandene Glykogen schon verschwunden sein kann, und daß der mikrochemische Nachweis vielleicht nicht sehr zuverlässig ist. Allerdings fand *Athanasiu*[1]) auch mit der *Pflüger*schen Methodik im Zentralnervensystem der Frösche nur 0,07 Proz. *Schöndorff*[2]) hat jedoch an sechs gut gefütterten Hunden im Gehirn einen Glykogengehalt von im Mittel 0,23 Proz. (0,196 bis 0,266 Proz.) der frischen Substanz beobachtet. *Asher* und *Takahashi* (a. a. O.) haben Zweifel geäußert, ob die nach der *Pflüger*schen Methode von ihnen bestimmte Substanz (der Gehalt des Gehirns betrug im Mittel 0,039 Proz. beim Kaninchen und 0,075 Proz. bei der Ratte) auch wirklich zur Gänze Glykogen gewesen sei; mit dem von *Rona* und *van Eweyk*[3]) kürzlich angegebenen nephelometrischen Verfahren konnten nur viel geringere Mengen gefunden werden. Es ist aber, auch wenn man von den Experimenten mit vorangegangener Extraktion, die vielleicht nicht vollständig war, absieht, nicht recht einzusehen, was für andere in kaltem Alkohol unlösliche, in heißem Wasser lösliche Stoffe als Glykogen beim Kochen mit Salzsäure reduzierende Substanzen liefern sollten.

I. Der Gehalt an Glykogen und Cerebrosidzucker zu verschiedenen Jahreszeiten.

Der Glykogengehalt des Zentralnervensystems (CNS) der Frösche ist wie auch der anderer Organe (vgl. *Athanasiu*, a. a. O.) in hohem Maße abhängig von der Jahreszeit. Während er in den Wintermonaten (November bis Februar) den außerordentlich hohen Wert von 1 bis 1,4 Proz. der frischen Substanz erreicht, beginnt er im Frühjahr abzusinken und zeigt im Juli und August sein Minimum mit 0,1 bis 0,2 Proz. Ähnliches gilt auch für den Gehalt an Cerebrosidzucker. Das Wintermaximum lag hier meist zwischen 0,2 und 0,4 Proz.; beim Absinken des Gehalts im Frühjahr trat ein auffälliger Unterschied der Geschlechter zutage, indem bei den Weibchen schon im Mai, bei den Männchen erst im August ein gänzliches Verschwinden desselben zu beobachten war.

Die folgende Tabelle I gibt eine Zusammenstellung der Werte, die an dem ganzen oder meist einer Hälfte des der Länge nach geteilten (in leichter Äthernarkose herauspräparierten) CNS gefunden

---

[1]) *J. Athanasiu*, Pflügers Arch. **74**, 561, 1899.
[2]) *B. Schöndorff*, ebendaselbst **99**, 191, 1903.
[3]) *P. Rona* und *C. van Eweyk*, diese Zeitschr. **149**, 174, 1924.

wurden. Die Versuche 1 bis 15 und 28 sind mit vorangehender Extraktion des Cerebrosidzuckers angestellt (und zwar 1 bis 3 mit Aceton, 9, 11 und 12 mit Petroläther, alle übrigen mit absolutem Alkohol), der Rest mit nachträglicher Wasserextraktion des Glykogens aus der Alkoholfällung (siehe Methodik). Versuch 27 und 29 sind Doppelbestimmungen an den beiden Hälften desselben Präparats.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Geschlecht	Gehalt an (in Proz. d. frischen Substanz)	
			Glykogen	Cerebrosidzucker
1	19. V.	♀	0,70	0
2	21. V.	♂	0,42	0,21
3	22. V.	♀	0,65	0
4	31. V.	♀	0,43	0
5	2. VI.	♀	0,45	0
6	5. VI.	♂	0,40	0,12
7	24. VI.	♀	0,19	0
8	26. VI.	♀	0,19	0
9	27. VI.	♂	0,28	0,20
10	30. VI.	♂	0,26	0,26
11	2. VII.	♂	0,25	0,24
12	3. VII.	♀	0,23	0
13	4. VII.	♂	0,19	0,10
14	5. VII.	♂	0,19	0,13
15	23. VII.	♂	0,18	0,10
16	19. VIII.	♂	0,17	0
17	20. VIII.	♀	0,14	0
18	21. VIII.	♂	0,37	0,03
19	22. VIII.	♂	0,14	0
20	23. VIII.	♀	0,18	0
21	3. XI.	♂	1,18	0,25
22	5. XI.	♂	1,42	0,18
23	8. XI.	♂	1,12	0,35
24	8. XI.	♂	1,21	0,27
25	9. XI.	♂	1,17	0,29
26	9. XI.	♂	1,16	0,32
27	12. XI.	♀	1,05	0,26
			1,09	0,27
28	5. XII.	♂	1,23	0,30
29	19. II.	♀	1,30	0,36
			1,28	0,41
30	20. II.	♂	1,33	0,43
31	23. II.	♂	1,32	0,49
32	25. II.	♀	1,35	0,32
33	4. IV.	♂	0,32	0,13

II. Der Umsatz an Zuckerstoffen.

1. Der Ruheumsatz unter verschiedenen Bedingungen.

Bei längerer Aufbewahrung des CNS in O-gesättigter 0,7 proz. NaCl-Lösung verschwindet ein beträchtlicher Teil der Zuckerstoffe, wie die folgenden Versuche zeigen, bei denen in je einer Hälfte des längsgeteilten CNS der Gesamtgehalt der Alkoholfällung an Zucker-

stoffen zu Beginn und in der anderen Hälfte nach 22- bis 24stündigem Verweilen unter den genannten Bedingungen bei Zimmertemperatur untersucht wurde:

	Anfangsgehalt Proz.	Endgehalt Proz.
1	0,82	0,31
2	0,56	0,26
3	0,75	0,30

Der an sich geringe Gehalt bei den Sommerfröschen kann auf diese Weise völlig zum Verschwinden gebracht werden. Dagegen war merkwürdigerweise in drei Versuchen, in denen das (ungeteilte) isolierte CNS nicht in Lösung, sondern in einer O-Atmosphäre aufbewahrt wurde, der Glykogengehalt am Ende der 24stündigen Versuchsperiode genau so groß, wie er zu jener Jahreszeit an den frisch untersuchten Präparaten zu sein pflegte.

Der bei Aufbewahrung in einer O-haltigen Lösung zu beobachtende Umsatz erfolgt anscheinend in der Hauptsache bereits in den ersten 8 Stunden, wie die in Tabelle II zusammengestellten Versuche zeigen, in denen die beiden Längshälften des CNS teils nach gleich langem, teils nach verschieden langem Verweilen in O-NaCl-Lösung untersucht wurden. Die Versuche 4 und 5 zeigen zwischen dem Gehalt nach 7½ bzw. 8½ Stunden einerseits und 24 Stunden andererseits keine größeren Differenzen als die Versuche 1 bis 3; erst in dem Versuch von bloß 6stündiger Dauer sind solche vorhanden.

Tabelle II.

Nr.	Endgehalt der Alkoholfällung an Zuckerstoffen nach Stunden	Proz.	Nr.	Endgehalt der Alkoholfällung an Zuckerstoffen nach Stunden	Proz.
1	5	0,65	4	8½	0,40
	5	0,68		24	0,39
2	20	0,30	5	7½	0,28
	20	0,35		24	0,27
3	24	0,41	6	6	0,31
	24	0,39		24	0,23

Im Gegensatz zu dem, was nach dem anoxybiotischen Glykogenschwund in anderen Organen zu erwarten war, zeigte sich der Umsatz an Zuckerstoffen bedeutend herabgesetzt, wenn an Stelle von Sauerstoff *Stickstoff* oder *Wasserstoff* durch die Lösung geleitet wurde. Dies zeigen die folgenden Versuche, in denen je eine Hälfte des CNS in O-gesättigter, die andere ebensolange in O-freier Lösung gehalten wurde. In Versuch 1 und 2 wurde Stickstoff durchgeleitet und der

Gesamtzuckergehalt der Alkoholfällung untersucht, in Versuch 3 mit Wasserstoffdurchleitung ist der Glykogengehalt bestimmt:

Nr.	Endgehalt in Proz. bei	
	O-Zufuhr	O-Mangel
1	0,30	0,51
2	0,35	0,53
3	0	0,20

Um zu sehen, ob auch das in situ belassene Organ das gleiche befremdliche Verhalten zeige, wurden zwei Versuche in der Weise angestellt, daß ein Frosch durch Abbinden des Herzens in Äthernarkose und ein anderer einfach durch Aufenthalt in einer N-Atmosphäre erstickt wurde. Das nach 14½ bzw. 8 Stunden herauspräparierte CNS ergab in beiden Fällen ein völliges Fehlen des Glykogens, während zwei Kontrollpräparate des isolierten CNS, die ebensolange in einer N-Atmosphäre bzw. in O-freier Lösung gehalten waren, noch einen Glykogengehalt von 0,14 bzw. 0,06 Proz. aufwiesen. An dem raschen postmortalen Glykogenschwund im Gesamtorganismus scheinen also noch andere Faktoren (Adrenalin?) beteiligt zu sein, die im isolierten Organ fehlen.

Viel stärker noch als durch O-Mangel wird der Umsatz der Zuckerstoffe durch Narkose mit 1 Proz. Urethan herabgedrückt. Von zwei CNS-Hälften, von denen die eine 23 Stunden in gewöhnlicher NaCl-Lösung, die andere ebensolange in einer solchen mit Zusatz des genannten Narkotikums gehalten wurde, zeigte die erste einen Endgehalt von 0,49, die zweite dagegen einen solchen von 0,84 Proz. In einem weiteren Versuch wurden beide CNS-Hälften zuerst 24 Stunden in Urethan-NaCl-Lösung gehalten. Die eine Hälfte ergab dann einen Gehalt von 0,73 Proz., die andere wurde durch weitere 24 Stunden in narkoticumfreier NaCl-Lösung aufbewahrt. Ihr Endgehalt betrug jetzt 0,30 Proz. Während also sonst, wie wir oben gesehen haben, der Umsatz der Zuckerstoffe in den ersten 8 Stunden ziemlich beendet ist, wurde hier der offenbar durch die Narkose vor der Zersetzung geschützte Vorrat nachträglich zum großen Teile verbraucht. Ganz analoge Verhältnisse konnten wir kürzlich auch für den Umsatz des NH_3-bildenden Materials im CNS feststellen[1]).

Dagegen ergab überraschenderweise der *Zusatz von 0,5 Proz. Traubenzucker* keine Verminderung des Umsatzes an Zuckerstoffen, wie sie auf Grund der Verwertung dieses Zuckers[2]) und der sparenden

[1]) *H. Winterstein* und *E. Hirschberg*, diese Zeitschr. **156**, 138, 1925.

[2]) *Dieselben*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 185, 1917; **101**, 248, 1918.

Wirkung, die er auf den Stickstoff-, Fett-, und Phosphorumsatz ausübt[1]), zu erwarten gewesen wäre. Wir werden auf diese Erscheinung noch genauer zurückkommen. Beispiele geben die Versuche 2 und 3 der folgenden Tabelle III, in denen der Endgehalt an Zuckerstoffen bei den in glucosehaltiger Lösung aufbewahrten Hälften des längsgeteilten CNS sogar geringer, der Umsatz also größer war als bei den in der zuckerfreien Lösung gehaltenen. Versuch 1 gibt zur Kontrolle den Vergleich zweier CNS-Hälften, die beide unter gleichen Bedingungen, nämlich in zuckerfreier Lösung gehalten waren. Versuchsdauer in 1 20, in 2 und 3 je 24 Stunden.

Tabelle III.

Nr.	Versuchsbedingungen	Endgehalt in Proz. an	
		Glykogen	Cerebrosidzucker
1	NaCl-Lösung	0,80	0,13
	" "	0,86	0,10
2	" " + Glucose	0,69	0,11
	" " ohne Glucose	0,77	0,21
3	" " + Glucose	0,60	0,15
	" " ohne Glucose	0,72	0,21

Anhang. Versuche an peripheren Nerven.

Eine Reihe von Versuchen wurde in der gleichen Weise wie am CNS am peripheren Froschnerven (Nn. ischiadici) angestellt. Der Gesamtgehalt der Alkoholfällung an Zuckerstoffen betrug in fünf Versuchen im Mittel 0,5 Proz. der frischen Substanz (0,40 bis 0,58 Proz.; ein Versuch mit dem ausnahmsweise niedrigen Wert von 0,28 Proz. ist nicht berücksichtigt). Fünf Versuche, in denen die Nerven 24 (einmal 23) Stunden in mit Sauerstoff gesättigter NaCl-Lösung belassen wurden, ergaben einen Endgehalt von im Mittel 0,22 Proz. (0,15 bis 0,27 Proz.). Auch hier wurde der Umsatz durch Zusatz von 1 Proz. Urethan unterdrückt. Im Gegensatz zu den eben angeführten Versuchen am CNS aber bewirkte Zusatz von Zucker zur Versuchslösung eine deutliche Verminderung des Umsatzes. In zwei Versuchen mit 0,5 Proz. Glucose-NaCl-Lösung betrug der Endgehalt nach 23 bzw. 24 Stunden 0,36 bzw. 0,40 Proz., und in zwei weiteren Versuchen mit 0,5 Proz. Galaktose sogar 0,51 Proz., also ebensoviel wie sonst der Gehalt der frisch untersuchten Nerven.

2. Der Reizstoffwechsel.

Noch überraschender als das Fehlen eines Einflusses der Zuckerzufuhr auf den Ruheumsatz der Zuckerstoffe im CNS waren die Er-

[1]) *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, diese Zeitschr. **105**, 1, 1919; **108**, 9, 1919; *E. Hecker* und *H. Winterstein*, ebendaselbst **129**, 205, 1923.

gebnisse der Versuche, die über die Wirkung elektrischer Reizung auf den Umsatz derselben angestellt wurden. Unsere früheren Versuche (a. a. O.) hatten ergeben, daß elektrische Reizung eine gewaltige Steigerung des Zuckerumsatzes in der umgebenden Lösung herbeiführt, so daß der Reizstoffwechsel bis auf das 2½fache des Ruhestoffwechsels ansteigen kann. Dies sowohl wie die sonstigen Erfahrungen über den Einfluß der Tätigkeit auf den Glykogengehalt der Muskeln und des Gesamtorganismus ließen geradezu mit Sicherheit eine starke Abnahme des Gehalts an Zuckerstoffen in den gereizten Präparaten erwarten. Aber gerade das *Gegenteil* wurde beobachtet: *Der Glykogengehalt der elektrisch gereizten Präparate war ausnahmslos größer als der der ungereizten.*

So betrug z. B. bei zwei unter den gleichen Bedingungen gehaltenen ungeteilten CNS-Präparaten der Endgehalt an Zuckerstoffen bei dem gereizten 0,64 Proz., bei dem ungereizten 0,52 Proz., in einem anderen an zwei Rückenmarken (ohne Gehirn) angestellten Versuche 0,93 gegen 0,80 Proz. Die Reizung erfolgte hier wie auch in den früheren Versuchen stets durch rhythmische Reihen von Induktionsschlägen, die durch eine elektrische Kontaktuhr ausgelöst wurden. Um nachzuprüfen, ob sich diese Präparate vielleicht überhaupt hinsichtlich des Zuckerumsatzes anders verhielten als die vor Jahren untersuchten, wurden zwei Versuche in der Weise angestellt, daß von zwei bzw. vier Fröschen je ein bzw. zwei ungeteilte CNS-Präparate in 0,5 Proz. Traubenzucker enthaltender physiologischer NaCl-Lösung gereizt, die anderen ein bzw. zwei Präparate unter den gleichen Bedingungen in Ruhe belassen wurden. Am Ende der je 8stündigen Versuchsperiode wurde sowohl der Gehalt der Präparate an Zuckerstoffen (Glykogen + Cerebrosidzucker zusammen) wie der Zuckerverlust der umgebenden Lösung untersucht. Die Resultate gibt die folgende Tabelle IV. Beide Versuche zeigen übereinstimmend, daß der Gehalt an Zuckerstoffen in den gereizten Präparaten wieder *größer* ist als in den ungereizten, obwohl der Zuckerverbrauch in der umgebenden Lösung, ganz entsprechend unseren früheren Versuchsergebnissen, durch Reizung auf das 2- bis 3fache gesteigert war.

Tabelle IV.

Nr.	Versuchsbedingungen	Endgehalt an Zuckerstoffen in Proz.	Zuckerverbrauch in der Lösung in mg per 1 g CNS
1	Ruhe	0,24	0,28
	Reizung	0,40	0,88
2	Ruhe	0,30	0,91
	Reizung	0,42	2,25

Am sichersten ergibt sich die eigenartige Wirkung der Reizung wieder aus Versuchen, in denen an ein und demselben Präparat in je einer Längshälfte der Umsatz an Zuckerstoffen in der Ruhe und bei Reizung miteinander verglichen wurde. Drei solche Versuche gibt die folgende Tabelle V. Nr. 1 ist in NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,5 Proz. Glucose, die beiden anderen sind in gewöhnlicher NaCl-Lösung angestellt. Temperatur in Nr. 1 = 16 bis 16,5°, in 2 und 3 = 19 bis 20,5°.

Tabelle V.

Nr.	Datum	Geschlecht	Versuchsdauer in Std.	Versuchsbedingungen	Endgehalt in Proz.	
					Glykogen	Cerebrosidzucker
1	31. XII.	♀	8	Reizung	0,71	0,15
				Ruhe	0,54	0,18
2	4. II.	♀	8	Reizung	0,87	0,22
				Ruhe	0,775	0,30
3	6. II.	♂	6	Reizung	1,09	0,33
				Ruhe	0,89	0,26

Durchweg ist der Glykogengehalt der gereizten Präparate größer; der Gehalt an Cerebrosidzucker läßt keinen deutlichen Unterschied erkennen.

Zur Gewinnung *absoluter Werte* des Umsatzes wurden vier Versuche in der Weise angestellt, daß je eine Längshälfte des CNS gleich untersucht, die andere nach 8stündigem Aufenthalt in O-durchströmter physiologischer NaCl-Lösung. In zwei Versuchen wurden der Ruheumsatz, in zwei der Reizstoffwechesl bestimmt. Temperatur = 18,5 bis 19°. Datum 5. bis 9. November. Alle vier Frösche Männchen. Die Resultate gibt die folgende Tabelle VI.

Tabelle VI.

Nr.	Versuchsbedingungen	Endgehalt in Proz.		Verbrauch pro g u. Std. in mg	
		Glykogen	Cerebrosidzucker	Glykogen	Cerebrosidzucker
1	Gleich untersucht	1,21	0,27		
	8 Stunden Ruhe	0,81	0,14	0,50	0,16
2	Gleich untersucht	1,16	0,32		
	8 Stunden Ruhe	0,78	0,23	0,48	0,11
3	Gleich untersucht	1,12	0,35		
	8 Std. Reizung	0,81	0,08	0,39	0,34
4	Gleich untersucht	1,17	0,29		
	8 Std. Reizung	0,89	0,08	0,35	0,26

Soweit ein Vergleich zwischen verschiedenen Präparaten zulässig ist, zeigen auch diese Versuche wieder eine *Verringerung des Glykogen-*

schwunds bei Reizung, während der Verbrauch an Cerebrosidzucker eine Steigerung erfahren zu haben scheint.

Zur Untersuchung des *Einflusses einer Zuckerzufuhr* auf die Größe des Verbrauchs an Zuckerstoffen bei Reizung wurde in zwei Versuchen der Endgehalt an diesen nach 8stündiger Reizung in Lösungen mit und ohne Zusatz von 0,5 Proz. Glucose an je zwei Längshälften desselben CNS miteinander verglichen. Die Resultate zeigen die Versuche 4 und 5 der folgenden Tabelle VII. Nr. 1 bis 3 sind Kontrollversuche zur Feststellung, inwieweit der Verbrauch an Zuckerstoffen bei Reizung in beiden Hälften gleichmäßig vor sich geht. Datum der Versuche 19. bis 23. Dezember, Temperatur = 16,5 bis 20°.

Tabelle VII.

Nr.	Endgehalt in Proz.		Versuchslösung
	Glykogen	Cerebrosidzucker	
1	0,74	0,19	0,7 Proz. NaCl-Lösung
	0,77	0,22	0,7 " " "
2	0,80	0,28	0,7 " " "
	0,86	0,35	0,7 " " "
3	0,90	0,24	0,7 " " " + 0,5 Proz. Glucose
	0,81	0,24	0,7 " " " + 0,5 " "
4	0,96	0,17	0,7 " " " + 0,5 " "
	0,80	0,31	0,7 " " " ohne "
5	0,81	0,15	0,7 " " " + 0,5 " "
	0,70	0,24	0,7 " " " ohne "

Die Versuche zeigen eine leichte Ersparnis an Glykogen, der merkwürdigerweise ein etwas erhöhter Verbrauch an Cerebrosidzucker gegenübersteht.

Daß der Umsatz an Glykogen im erregten CNS tatsächlich kleiner sein sollte als im ruhenden, muß nach allen unseren Erfahrungen offenbar als höchst unwahrscheinlich bezeichnet werden; wenn trotzdem der Glykogengehalt des ersteren ein größerer ist, so liegt es nahe, diese Erscheinung so zu erklären, daß im CNS ebenso wie wir dies vom Muskel wissen, Abbau und Aufbau des Glykogens einander gegenüberstehen, und daß die Reizung auf irgendwelche Weise eine Förderung des Aufbaues bewirkt. Wenn andererseits die Zufuhr eines im Stoffwechsel nachweislich gut verwerteten Zuckers für diesen Aufbau, zum mindesten im ruhenden Organ ohne größeren Einfluß bleibt, so liegt wieder der Gedanke nahe, das Fehlen eines für die Glykogensynthese wesentlichen Faktors dafür verantwortlich zu machen. Von diesen Gesichtspunkten aus gingen wir dazu über, den Einfluß des Insulins auf den Umsatz der Zuckerstoffe im CNS zu untersuchen.

3. Insulinversuche.

Wir verwendeten zwei Präparate: das dänische Insulin „Leo“, das in Pastillen in den Handel gebracht wird, und das in Lösung befindliche deutsche Präparat Insulin „Tetewop“. Als wir bei Verwendung der beiden Präparate zuerst einander geraoe entgegengesetzte Resultate erhielten, ergab sich, daß das Insulin „Leo“ versehentlich in einer 10mal höheren Konzentration angewandt worden war. Dies war die Veranlassung, in einigen Versuchen den Einfluß der Konzentration des zugesetzten Insulins auf den Zuckerstoffgehalt des CNS zu untersuchen. In der folgenden Tabelle VIII sind diese Konzentrationsversuche und zwei mit zu hohen Konzentrationen des Insulins Leo angestellte Experimente wiedergegeben; in den letzteren (Nr. 1 und 2) wurde die eine CNS-Hälfte in gewöhnlicher NaCl-Lösung, die andere in solcher mit Insulinzusatz gehalten, in Versuch 3 und 4 war jede Hälfte einer anderen Konzentration des betreffenden Insulinpräparats ausgesetzt. Die angegebene Insulinmenge bedeutet die Anzahl klinischer Einheiten, die zu den 5 ccm der Versuchslösung, in denen sich das CNS stets befand, zugesetzt waren. Alle vier Versuche sind Ruheversuche.

Tabelle VIII.

Nr.	Datum	Geschlecht	Versuchsdauer Std.	Lösung	Endgehalt in Proz. Glykogen	Cerebrosidzucker
1	31. XII.	♀	24	NaCl	0,67	0,21
				„ + 2 E. Ins. Leo	0	0,13
2	2. I.	♂	24	„	0,72	0,27
				„ + 2 E. Ins. Leo	0,11	0,16
3	27. II.	♂	16	„ + 0,2 E. Ins. Leo	1,25	0,46
				„ + 0,1 E. Ins. Leo	1,78	0,60
4	2. III.	♂	8	„ + 2 E. Ins. Tetewop	0,21	0,21
				„ + 0,2 E. Ins. Tetewop	0,84	0,37

Wie diese Versuche zeigen, bewirken zu hohe Konzentrationen Insulin (zwei Einheiten auf 5 ccm) ein weitgehendes Schwinden des Glykogens und auch eine Abnahme des Cerebrosidzuckers, während geringe Konzentrationen (0,1 bis 0,2 Einheiten) wie jetzt noch genauer untersucht werden soll, gerade die entgegengesetzte Wirkung ausüben. Alle folgenden Versuche sind mit 0,2 Einheiten Insulin Tetewop angestellt.

In der folgenden Tabelle IX sind alle Versuche wiedergegeben, in denen der Endgehalt an Zuckerstoffen mit und ohne Insulinwirkung untersucht wurde, und zwar in Versuch 1 bis 8 an je zwei Hälften

desselben CNS, in Versuch 9 bis 11 an je zwei ungeteilten CNS-Präparaten, die zur Erleichterung des Eindringens der Zuckerlösung von ihrer Gefäßhaut befreit waren. Alle Versuche sind an Froschmännchen bei Zimmertemperatur (16 bis 21°) angestellt, die innerhalb eines Versuchs um höchstens 2° variierte.

Tabelle IX.

Nr.	Datum	Dauer Std.	Versuchsbedingung	Versuchslösung	Endgehalt in Proz.	
					Glykogen	Cerebrosidzucker
1	5. I.	24	Ruhe	NaCl-Lösung	0,78	0,28
				+ Insulin	1,28	0,29
2	9. II.	8	„	NaCl-Lösung	0,88	0,26
				+ Insulin	1,32	0,34
3	10. II.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,81	0,26
				+ Insulin	1,43	0,49
4	11. II.	6	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,89	0,22
				+ Insulin	1,36	0,49
5	12. II.	8	Reizung	NaCl-Lösung	1,33	0,32
				+ Insulin	1,50	0,57
6	13. II.	8	„	NaCl-Lösung	0,84	0,30
				+ Insulin	1,43	0,45
7	16. II.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,96	0,31
				+ Insulin	1,84	0,60
8	17. II.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	1,01	0,28
				+ Insulin	1,89	0,67
9	20. III.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,40	0,11
				+ Insulin	0,73	0,37
10	1. IV.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,28	0,10
				+ Insulin	0,66	0,30
11	6. IV.	8	„	NaCl + 0,5 Glucose	0,32	0,08
				+ Insulin	0,68	0,30

Ein Blick auf die Tabelle IX lehrt, daß die Anwesenheit von Insulin überall eine Steigerung sowohl des Gehalts an Glykogen wie an Cerebrosidzucker bewirkt, die schon an dem in gewöhnlicher NaCl-Lösung ruhenden CNS deutlich wahrnehmbar ist, sowohl durch Reizung wie durch Zufuhr von Traubenzucker noch eine Erhöhung erfahren kann, und bei gleichzeitiger Einwirkung beider Faktoren den am Ende der Versuchsperiode feststellbaren Zuckerstoffgehalt auf eine Höhe treibt, wie sie an frisch untersuchten Präparaten niemals zur Beobachtung kommt. Dieses Verhalten wird vielleicht noch klarer veranschaulicht durch die folgende Tabelle X, in welcher die durch das Insulin unter verschiedenen Bedingungen erzielte Steigerung des Zuckerstoffgehalts in Prozenten des ohne Insulin zu beobachtenden Gehalts ausgedrückt ist.

Tabelle X.

Nr.	Versuchsbedingungen	Steigerung d. Endgehalts b. Insulinwirkung in Proz. des Endgehalts ohne Insulin	
		Glykogen	Cerebrosidzucker
1	Ruhe ohne Zucker	64	—
2	„ „ „	50	31
3	„ mit „	76	88
4	„ „ „	53	123
5	Reizung ohne Zucker	13	77
6	„ „ „	70	50
7	„ mit „	92	94
8	„ „ „	87	139
9	„ „ „	83	237
10	„ „ „	135	200
11	„ „ „	113	275

Während also die Zuckerzufuhr sonst keine oder nur eine geringe Steigerung des Glykogen- und Cerebrosidgehalts zu bewirken vermag, ist dies unter Insulineinwirkung in hohem Maße der Fall. Andererseits bewirkt auch unter diesen Bedingungen die Reizung noch eine weitere Steigerung, und zwar sowohl bei Zuckerzufuhr wie ohne diese. Dies zeigen deutlich die beiden folgenden Versuche, in denen der Zuckerstoffgehalt zweier CNS-Hälften unter Insulineinwirkung in Ruhe und Reizung miteinander verglichen wurde, und zwar im ersten Versuch ohne und im zweiten mit Zusatz von 0,5 Proz. Glucose zur Insulin-NaCl-Lösung. Der prozentige Endgehalt betrug:

Nr.		Glykogen	Cerebrosidzucker
1	In der Ruhe	1,22	0,39
	Bei Reizung	1,42	0,50
2	In der Ruhe	1,33	0,37
	Bei Reizung	1,70	0,60

Um zu sehen, ob vielleicht eine Ruhepause *nach* vorangegangener Reizung die Glykogenbildung zu steigern vermöge, wurden zwei Versuche in der Weise angestellt, daß von den in zuckerhaltigen Lösungen gehaltenen CNS-Hälften die eine durch 8 Stunden, die andere nur durch 4 Stunden gereizt und dann durch 4 Stunden in Ruhe belassen wurde. Aber sowohl ohne wie bei Insulinwirkung war der Glykogengehalt des länger gereizten Präparats der größere, und auch ein längeres Aufbewahren nach Ablauf der 8stündigen Reizperiode bewirkte in einem weiteren Versuch nur ein Absinken des Glykogengehalts. Die Versuche sind in der folgenden Tabelle XI wiedergegeben.

Schon die in Tabelle IX angeführten Versuche 5 bis 8 hatten unzweifelhaft ergeben, daß es sich bei der unter Traubenzucker-Insulin-

Tabelle XI.

Nr.	Versuchslösung	Versuchsbedingungen	Endgehalt in Proz.	
			Glykogen	Cerebrosidzucker
1	NaCl-Glucose	4h Reizung + 4h Ruhe	0,90	0,22
		8h Reizung	1,04	0,19
2	desgl. + Insulin	4h Reizung + 4h Ruhe	1,38	0,45
		8h Reizung	1,70	0,65
3	„ + „	8h Reizung	1,68	0,52
		8h Reizung + 16h Ruhe	0,84	0,50

wirkung zu beobachtenden Steigerung des Endgehalts an Glykogen und Cerebrosidzucker nicht etwa einfach um eine Schonung der vorhandenen Vorräte, sondern um einen *Aufbau* handeln müsse. Um dies noch besser sicherzustellen, wurde in drei Versuchen der Zuckerstoffgehalt der einen CNS-Hälfte gleich nach der Präparation, der der anderen nach Insulineinwirkung untersucht. Die Versuche sind Ende Februar angestellt, die beiden ersten an Männchen, der dritte an einem Weibchen. Die Resultate gibt Tabelle XII.

Tabelle XII.

Nr.	Versuchslösung	Versuchsbedingungen	Proz. Gehalt an			
			Glykogen		Cerebr.-Zucker	
			Anfang	Ende	Anfang	Ende
1	NaCl + Insulin	8h Reizung	1,33	1,47	0,43	0,50
2	„ + „ + Glucose	11h Reiz. + 9h Ruhe	1,32	1,84	0,49	0,80
3	„ + „ + „	8h Reizung	1,35	1,64	0,32	0,62

Daraus ergibt sich eine *absolute Zunahme* an:

Nr.	Glykogen		Cerebrosidzucker	
	Proz. der frischen Substanz	Proz. des Anfangsgehalts	Proz. der frischen Substanz	Proz. des Anfangsgehalts
1	0,14	15	0,07	16
2	0,52	39	0,31	63
3	0,29	22	0,30	94

Auf Grund der Ergebnisse der Insulinversuche können wir nunmehr das folgende Bild von dem Zuckerstoffwechsel in den Nervenzentren entwerfen, durch das die zunächst befremdlichen Resultate der in den früheren Abschnitten mitgeteilten Versuche einer befriedigenden Erklärung zugänglich erscheinen. Offenbar laufen sowohl im Ruhe- wie im Reizstoffwechsel Abbau- und Aufbauvorgänge nebeneinander einher. Bei dem in gewöhnlicher NaCl-Lösung gehaltenen

Organ überwiegen die ersteren, so daß eine Abnahme der ursprünglich vorhandenen Vorräte eintritt, und zwar sowohl in der Ruhe wie bei Reizung. Aber die durch die Reizung ausgelösten chemischen Prozesse wirken in so hohem Maße fördernd auf den Aufbau, daß trotz der, wie wir wohl annehmen dürfen, gleichfalls gesteigerten Glykogenzersetzung, die Abnahme desselben nicht so stark ist wie in der Ruhe. Zugeführten Zucker vermag das isolierte CNS in der Ruhe nicht, bei Reizung nur in sehr beschränktem Maße dem Aufbau nutzbar zu machen, weil das dazu nötige Insulin nicht in genügender Menge vorhanden ist. Wird dieses hinzugefügt, so findet schon im Ruhestoffwechsel und auch ohne Zuckerzufuhr eine bedeutende Steigerung des Aufbaues statt, nicht bloß des Glykogens, sondern auch der Cerebroside. Wird dieser Aufbau noch durch Zuckerzufuhr und durch Reizung unterstützt, so kann er in solchem Umfange vor sich gehen, daß der Endgehalt an Zuckerstoffen den ohne Insulinwirkung zu beobachtenden unter sonst gleichen Bedingungen beim Glykogen um etwa 100 Proz., bei den Cerebrosiden sogar um 200 Proz. übertrifft und auch weit über den am frisch untersuchten Präparat feststellbaren Anfangsgehalt hinausgeht.

Der gesteigerte Ansatz von Zuckervorräten unter Insulineinwirkung scheint nicht mit einer Erhöhung, sondern mit einer Verminderung des Zuckerverbrauchs in der umgebenden Lösung einherzugehen. In Versuch 10 der Tabelle IX (S. 363) betrug dieser während der 8stündigen Versuchsperiode bei den mit Insulin gehaltenen CNS-Präparaten 2,53 mg pro 1 g, bei den ohne Insulin gehaltenen 2,91 mg, in Versuch 11 2,36 bzw. 2,67 mg.

Eine Zunahme des Glykogengehalts im Gehirn unter der Einwirkung von Insulin ist bereits von *Asher* und *Takahashi* (a. a. O.) bei ihren am Gesamtorganismus angestellten Versuchen an Ratten beobachtet worden. Beim Kaninchen fanden sie zunächst eine gewaltige Abnahme der Kohlenhydrate des Gehirns, aber offenbar infolge der zu hohen krampferzeugenden Dosen, ganz entsprechend unseren mit zu hohen Insulinkonzentrationen angestellten Versuchen (vgl. S. 362). Daß diese Abnahme durch die Krämpfe bedingt war, erschlossen sie aus weiteren Versuchen, die ergaben, daß bei Ausbleiben der Krämpfe das Insulin eine Zunahme bewirkte, die allerdings nicht so groß war wie bei den Ratten, und daß andererseits Krampfgifte, wie das Pikrotoxin, beim Kaninchen eine bedeutende Verringerung des Kohlenhydratgehalts des Gehirns erzeugte. Die gleiche Wirkung wurde auch an Ratten bei leichter Strychninvergiftung (in Kombination mit anderen eine Zuckerverarmung bewirkenden Faktoren) beobachtet.

Zur Nachprüfung dieses Verhaltens beim isolierten CNS des Frosches wurden noch einige Versuche mit Strychninvergiftung angestellt.

4. Strychninversuche.

Die Resultate mögen am besten an der Hand der folgenden Tabelle XIII besprochen werden. Die Versuche sind in der zweiten Märzhälfte sämtlich an Männchen angestellt. Die Versuchsdauer betrug stets 8 Stunden, Temperatur = 16 bis 19°. Der Strychningehalt der Lösungen betrug 0,0005 Proz. (0,025 mg in 5 ccm). Selbstredend wurde hier wie in allen anderen Versuchen ständig Sauerstoff durch die Lösung geleitet. In jedem Versuch ist der Zuckerstoffgehalt der beiden Längshälften des gleichen CNS-Präparats verglichen.

Tabelle XIII.

Nr.	Versuchslösung	Versuchsbedingungen	Endgehalt in Proz.	
			Glykogen	Cerebr.-Zucker
1	NaCl-Lösung	Ruhe	0,37	0,22
	NaCl + Strychnin	„	0	0
2	„ + „	„	0	0
	„ + „	Reizung	0,14	0,08
3	NaCl + Strychnin + Glucose	Ruhe	0,14	0,27
	„ + „ + „	Reizung	0,22	0,07
4	NaCl + Strychnin + Glucose	Ruhe	0,12	0,15
	„ + „ + „ + Insulin	„	0	0,19
5	„ + „ + „ ohne „	„	0,24	0,11
	„ + „ + „ + „	Reizung	0,40	0,28

Die Versuche sind wohl nicht zahlreich genug, um ein abschließendes Urteil zu ermöglichen, und ihre Fortsetzung wurde durch den um diese Jahreszeit bereits zu niedrigen Zuckerstoffgehalt des CNS verhindert. Als auffälligstes, in allen Versuchen übereinstimmendes Ergebnis aber muß verzeichnet werden, daß durch das Strychnin der Gehalt an Glykogen sowie an Cerebrosidzucker am ruhenden Präparat bedeutend vermindert, in Versuch 1 und 2 sogar völlig zum Verschwinden gebracht wurde, und daß die elektrische Reizung auch hier eine Steigerung des Glykogengehalts bewirkte. Dieses Ergebnis wirkt aus dem Grunde so befremdlich, weil nur die folgende Alternative zu bestehen scheint: Entweder das vergiftete CNS befand sich wirklich in Ruhe; dann ist nicht einzusehen, warum eine Änderung seines Gehalts an Zuckerstoffen gegenüber dem unvergifteten eintrat. In der Tat hat der eine von uns[1]) keine Änderung des Gaswechsels des ungereizten Froschrückenmarks unter dem Einfluß der Strychninvergiftung beobachtet. Nimmt man aber wieder an, daß das mit Strychnin vergiftete ungereizte Rückenmark sich nicht in Ruhe befand, sondern

[1]) *H. Winterstein*, Zentralbl. f. Physiol. **21**, 869, 1908.

etwa durch die Erschütterung infolge des durchperlenden Sauerstoffs in Erregung versetzt wurde, dann wäre nach den früheren Erfahrungen wieder nicht verständlich, warum diese Erregung eine Abnahme und nicht wie sonst eine Steigerung des Glykogengehalts bewirkte, und erst recht nicht, warum diese durch elektrische Reizung trotzdem herbeigeführt wurde. Es bleibt fürs erste wohl nur die Hypothese übrig, daß der durch das Strychnin erzeugte „Zustand gesteigerter Erregbarkeit“ mit einem vermehrten Abbau der Zuckerstoffe einhergeht, daß dagegen die Förderung des Aufbaues erst den durch die Reizung ausgelösten „Erregungsvorgängen“ zukommt.

Zusammenfassung.

Der *Gehalt* des CNS des Frosches an *Glykogen* und an *Cerebrosidzucker* ist in hohem Maße abhängig von der *Jahreszeit*. Er erreicht sein Maximum in den Wintermonaten (November bis Februar) mit 1 bis 1,4 Proz. der frischen Substanz Glykogen und 0,2 bis 0,4 Proz. Cerebrosidzucker. Im Frühjahr und Sommer sinkt er immer mehr ab, bis zu einem Minimum von 0,1 bis 0,2 Proz. Glykogen im Juli und August. Cerebrosidzucker war mit den von uns angewandten Methoden bei den Weibchen schon im Mai, bei den Männchen im August überhaupt nicht nachweisbar.

Das in O-gesättigter physiologischer NaCl-Lösung aufbewahrte *ungereizte CNS* erfährt eine *starke Abnahme des Gehalts an Zuckerstoffen*, die 50 Proz. und mehr betragen kann und in der Hauptsache in den ersten 8 Stunden des Überlebens stattfindet. *O-Mangel* (des isolierten, nicht aber des in situ belassenen Organs) und in noch höherem Maße *Narkose* mit 1 Proz. Urethan vermindern diese Abnahme. *Zuckerzufuhr* vermag sie nicht herabzusetzen.

Einige am *peripheren Nerven* angestellte Versuche ergaben auch hier eine Abnahme des Gehalts an Zuckerstoffen; sie wurde durch Narkose unterdrückt, durch Zuckerzufuhr vermindert.

Elektrische Reizung des CNS bewirkt *ausnahmslos eine deutliche Verminderung des Glykogenschwunds*, bei Zuckerzufuhr in noch etwas verstärktem Maße.

Insulin in zu hoher Konzentration (2 klinische Einheiten auf 5 ccm Versuchslösung) setzt den Gehalt des CNS an Zuckerstoffen stark herab. In geringerer Konzentration dagegen (0,1 bis 0,2 Einheiten auf 5 ccm) bewirkt es an dem in physiologischer NaCl-Lösung gehaltenen ungereizten CNS eine *bedeutende Zunahme des Glykogen- und Cerebrosidgehalts*. Diese Insulinwirkung kann durch Zufuhr von *Zucker* sowie durch *Reizung* noch erhöht und durch gleichzeitige Einwirkung beider Faktoren so gewaltig gesteigert werden, daß der Endgehalt an Glykogen um mehr als 100 Proz., derjenige an Cerebrosid-

zucker sogar um mehr als 200 Proz. höher sein kann als der unter den gleichen Bedingungen ohne Insulin aufbewahrten Präparate, und daß er auch den Anfangsgehalt des frisch untersuchten CNS bedeutend übersteigt.

Die Erklärung aller dieser Erscheinungen wird darin gesucht, daß Abbau und Aufbau der Zuckerstoffe im CNS nebeneinander einhergehen. Bei dem in gewöhnlicher NaCl-Lösung gehaltenen Organ überwiegen die ersteren und bewirken eine Abnahme der vorhandenen Vorräte, sowohl in der Ruhe wie bei Reizung. Doch wirken die durch die Reizung ausgelösten Vorgänge in so hohem Maße fördernd auf den Aufbau, daß die Abnahme eine geringere ist als in der Ruhe. Zugeführter Zucker kann dem Aufbau erst dann in größerem Umfange zugänglich gemacht werden, wenn das dazu nötige Insulin zur Verfügung steht; unter diesen Bedingungen kann dann der Aufbau den Abbau bei weitem übertreffen.

Einige mit *Strychninvergiftung* angestellte Versuche führten zu nicht leicht deutbaren Resultaten, die dafür zu sprechen scheinen, daß der „Zustand der gesteigerten Erregbarkeit“ mit einem vermehrten Abbau einhergeht, während die aufbaufördernde Wirkung erst den durch die Reizung ausgelösten „Erregungsvorgängen“ zukommt.

Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und die Ionendurchlässigkeit von Membranen.

III. Mitteilung: Potentiale an Pergamentmembranen.

Von

Akiji Fujita.

(Aus dem biochemischen Institut der Aichi-Medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 4. März 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In der vorangegangenen Mitteilung[1]) wurde gezeigt, daß die Apfelschale als eine Membran aufgefaßt werden kann, welche für Kationen permeabel und für Anionen impermeabel ist. *Beutner*, welcher die Potentiale der Apfelschale untersucht hat, deutet dieselben auf Grund der Phasengrenzpotentialtheorie, wobei er annehmen muß, daß die Substanz der Schale ein Lipoid darstellt, welches eine in Wasser unlösliche organische Säure enthält. In der vorangegangenen Mitteilung wurde gezeigt, daß diese Auffassung mit der Annahme einer reinen Kationenpermeabilität vereinbar ist; sie ist nicht ein Gegensatz, sondern sie kann nur als eine der möglichen Erklärungen für diese Semipermeabilität betrachtet werden. Als gesicherte Erkenntnis können wir nur die Semipermeabilität selbst betrachten, die wir direkt experimentell nachweisen konnten. Der Mechanismus der Semipermeabilität dagegen ist noch ein Problem, und der von *Beutner*

[1]) *Michaelis* und *Fujita*, diese Zeitschr. **158**, 28, 1925.

vorgeschlagene Mechanismus ist nur ein Versuch zur Erklärung desselben. Wenn derselbe allgemeingültig wäre, so müßte sich eine nichtlipoide Membran prinzipiell anders verhalten. Nun haben aber unter *Höber Vorschütz*, *Natannsen*, *Matsuo* und *Mond*[1]) gezeigt, daß man mit eiweißartigen Membranen dieselben elektromotorischen Effekte erhält, und damit ist es sicher, daß zum mindesten auch ein zweiter Mechanismus als der *Beutner*sche möglich ist. Um diese Frage zu fördern, sollen in dieser Arbeit einige Versuche mit Pergamentmembranen beschrieben werden. Diese sind ganz gewiß keine Lipoide, sie sind auch keine Eiweißkörper, und trotzdem werden wir zeigen, daß ähnliche elektromotorische Erscheinungen an ihnen nachgewiesen werden können. Die elektromotorischen Effekte sind bei den Pergamentmembranen kleiner als bei der Apfelschale, die Verschiedenheit der Untersuchungsmethode bringt auch sonst manche Unähnlichkeit der Resultate mit sich, aber das Gemeinsame ist, daß auch hier die Erscheinungen nur erklärt werden können durch die Annahme, daß die Pergamentmembran für Kationen besser durchlässig ist als für Anionen. Die Erscheinungen am Apfel bestehen hauptsächlich darin, daß der Apfel für alle Anionen praktisch fast undurchlässig zu sein scheint, während bei der Pergamentmembran nur quantitative Unterschiede in der Durchlässigkeit für Anionen und Kationen bestehen, die bei manchen Elektrolyten sehr stark, bei anderen fast gar nicht erkennbar sind. Jedenfalls ist ein gemeinsamer Mechanismus für die Wirkung der Apfelschale und der Pergamentmembran damit in den Bereich der Möglichkeit getreten, und das soll Veranlassung geben, in einer späteren Mitteilung die Theorie über den Mechanismus dieser Semipermeabilität zu revidieren. Zunächst sollen die experimentellen Befunde dieser Untersuchung mit Pergamentpapier mitgeteilt werden. Als Membranen wurden Pergamenthülsen in Form von Diffusionshülsen von *Schleicher* und *Schüll* benutzt. Dieselben wurden in folgender Anordnung verwendet. Die Pergamenthülsen wurden jedesmal vor dem Gebrauch mindestens 10 Minuten lang in fließendem Leitungswasser gewaschen, dann ungefähr ebensolange in destilliertes Wasser eingetaucht. Dann wurde die innere Fläche derselben mit der konzentrierteren Lösung, die äußere Fläche mit der verdünnteren Lösung gut abgespült, und nach dem Einfüllen der konzentrierteren Lösung I in die Hülse wird die ganze Hülse in die verdünntere Lösung II eingetaucht, welche sich in dem äußeren Becherglas be-

---

[1]) *Vorschütz*, Pflügers Arch. **189**, 181, 1921; **190**, 54, 1924; *Natannsen*, ebendaselbst **196**, 637, 1922; *Matsuo*, ebendaselbst **200**, 132, 1923; *Mond*, ebendaselbst **203**, 247, 1924.

fand (Abb. 1). Danach wurde die Potentialdifferenz in gewissen zeitlichen Intervallen gemessen, bis die in Abständen von einigen Minuten wiederholten Ablesungen konstant bleiben. Das Potential wurde aus der Lösung I und II vermittelst der Vorrichtung abgeleitet, die wir in einer früheren Arbeit[1]) schon beschrieben haben, und welche den Zweck hat, alle Diffusionspotentiale zu vernichten, mit Ausnahme des Potentialunterschieds der beiden Seiten der Membran. Die ableitenden Röhren sind zu diesem Zwecke mit einer mit KCl gesättigten Agargallerte gefüllt. Die Enden mit den trichterförmigen Erweiterungen sind nach oben abgebogen. Der Trichter selbst ist von Agar frei, und seine Spitze wird vor der Benutzung mit etwas festem KCl gefüllt und in diesem Zustande vorsichtig unter die Lösung getaucht. Auf diese Weise wird zwischen die mit KCl gesättigte Agargallerte und die Elektrolytlösung noch eine Zwischenschicht eingeschaltet, welche aus derselben Elektrolytlösung, aber noch dazu gesättigt mit KCl, besteht. Wir haben in einer früheren Arbeit[2]) die Wirksamkeit dieser Anordnung zur Vernichtung der Diffusionspotentiale schon gezeigt und wir werden an der späteren Stelle dieser Arbeit, wo wir die freien Diffusionspotentiale messen, eine neue Bestätigung dafür finden. Das andere Ende der Agarröhre wurde vermittelst einer gesättigten KCl-Lösung je mit einer mit KCl gesättigten Kalomelelektrode verbunden und das Potential mit Hilfe des Kompensationsverfahrens gemessen. Die Lösungen I und II enthielten stets den gleichen Elektrolyten, I in n/10, II in n/100 Äquivalentkonzentration. Das Potential stellt sich ziemlich schnell ein, innerhalb etwa 10 bis 15 Minuten. Diese Zeit ist bei manchen Fällen offenbar erforderlich, um das quasistationäre Konzentrationsgefälle innerhalb der Membran festzulegen. Im übrigen unterscheiden sich die sofort gemessenen Werte von dem definitiven meist nur wenig. Das nach etwa 10 bis 20 Minuten erreichte Potential hält sich lange konstant und zeigte bis 1 oder 2 Stunden keine Neigung, sich zu vermindern. Dies zeigt an, daß die Diffusion relativ langsam fortschreitet und die Rührung innerhalb der einzelnen Lösungen auch ohne besondere Rührvorrichtung durch die unvermeidlichen Erschütterungen für unsere Zwecke ausreichend ist. Die Versuche ergeben folgendes:

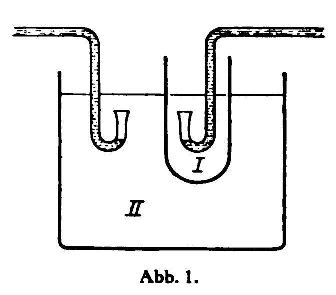


Abb. 1.

[1]) *Michaelis* und *Fujita*, Zeitschr. f. physik. Chem. **110**, 266, 1924.
[2]) *Dieselben*, diese Zeitschr. **142**, 398, 1923.

Tabelle I.

Zeitliche Änderung der Membranpotentiale in Millivolt (außen n/100 KCl, innen n/10 KCl; das Vorzeichen bezieht sich auf die dünnere Lösung).

Zeit der Ablesung nach der Ansetzung (in Minuten)	Hülse A					Hülse B				
	Frisch (am 13. Jan. 1925)	Über Nacht in dest. Wasser eingetaucht (am 14. Jan.)	Nach Messung von NaCl-Lösg. (am 14. Jan.)	In dest. Wasser gewaschen (am 15. Jan.)	Nach Messung verschiedener Lösungen (am 15. Jan.)	Frisch (am 13. Jan. 1925)	Über Nacht in dest. Wasser eingetaucht (am 14. Jan.)	Nach Messung von NaCl-Lösg. (am 14. Jan.)	In dest. Wasser eingetaucht (am 15. Jan.)	Nach Messung verschiedener Lösungen (am 15. Jan.)
Sofort	13	10	8	10	10	13	20	13	17	14
5	15	10	8	9,7	10	12,5	20	13	15,5	13,5
10	18	10,5	8	10,5	10,5	12,5	19,5	12,5	15,5	14
15	20	11	7,7	10	10	13	19	13	15,5	14
20	22	11	8	10		14,5	18,5	13	15,5	
25	23	10,5	8			15	18,5	13		
30	24	10,5	8			15,5	18	13		
40	25,3	10,3				16	18			
50	26	10				16	18			
60	26	10				15	17			
80	27					15				
100	27									

Tabelle II.

Zeitliche Änderung der Membranpotentiale in Millivolt (außen n/100, innen n/10 Lösung).

Zeit der Ablesung nach Ansetzung	Hülse A					Hülse B				
	$CaCl_2$	$AlCl_3$	NaCl	K_2SO_4	HCl	$CaCl_2$	$AlCl_3$	NaCl	K_2SO_4	HCl
Sofort	— 5,5	+0,5	—3,5	+29	+41	+3	—11,5	—1,5	+33	+43
Nach 5′	— 8,5	—2,5	—2	+29	+40	—2	—16,5	0	+33	+43
„ 10	—11	—3	—1	+29	+40	—5	—16,5	+1,0	+33	+42
„ 15	—12,5	—3	+1	+29	+40	—7,5	—16,5	+3,5	+33	+41,5
„ 20	—13	—3	+1	+29	+40	—7,5	—16,5	+4	+33	+41,5
„ 25	—13	—3	+1	+29		—7,7		+4,5	+33	+41,5
„ 30	—13					—7,5		+4		

Zunächst sieht man, daß die Werte individuell von der benutzten Hülse abhängen, für jede Hülse aber innerhalb weniger Millivolt reproduzierbar sind. Sodann ist die auffälligste Erscheinung, daß man bei dem Versuch mit KCl ein Potential von 10, bei der anderen Hülse 14 Millivolt in durchaus reproduzierbarer Weise erhält. Da verschieden konzentrierte KCl-Lösungen bei freier Diffusion kein meßbares Diffusionspotential ergeben, ist eine Betätigung der Membran damit bewiesen. Um diese auch für andere Elektrolyte zu zeigen, mußte das auf diese Weise gemessene Potential mit dem bei freier Diffusion entstehenden verglichen werden. Diese freien Diffusionspotentiale können berechnet werden. Um aber zu zeigen, daß unsere Versuchsanordnung zuverlässig

funktioniert, wurde das freie Diffusionspotential in einer besonderen Versuchsreihe mit den gleichen Elektrolytlösungen direkt gemessen.

Die Versuchsanordnung war folgende (Abb. 2). Die spezifisch leichtere Lösung wurde in ein großes Becherglas eingefüllt. Die schwerere befand sich in einem heberartigen Glasrohr, welches bei *a* und *b* einen durchbohrten Gummistopfen trug[1]). Durch die Öffnung bei *a* wurde das KCl-Agarrohr, wiederum mit trichterförmiger Aufbiegung, eingeführt, in der Spitze des Trichters waren KCl-Kristalle eingefüllt. Durch die Bohrung *c* geht ein schmales, oben fast kapillar endendes Glasrohr, die freie Berührungsstelle der beiden Lösungen befindet sich an der Öffnung dieses Glasrohrs. Die äußere Lösung wurde in ähnlicher Weise mit dem Agarrohr *d* abgeleitet, die Ableitung erfolgte wie vorher mit zwei gesättigten Kalomelelektroden. Es wurde stets die 0,1 äquivalent-normale Lösung eines Elektrolyten gegen eine 0,01 n Lösung desselben Elektrolyten gemessen. Diese Anordnung zur Messung der Diffusionspotentiale unterscheidet sich von den meist angewendeten dadurch, daß das Diffusionspotential hier die einzige elektromotorische Kraft der Kette ist, während sonst bei den meist üblichen Anordnungen mit Elektrolytlösungen verschiedener Konzentration die algebraische Summe eines Elektrodenpotentials und eines Diffusionspotentials zur Messung kommt. Die Voraussetzung für die Wirksamkeit unserer Anordnung ist, daß die Vorrichtung zur Ausschaltung aller anderen Diffusionspotentiale ausreichend ist. Die Ansprüche an die Vernichtung des Diffusionspotentials sind in unseren Versuchen zum Teil recht groß, da die eine Lösung die relativ hohe Konzentration von n/10 hat. Trotzdem stimmen die gemessenen Potentiale mit den berechneten meist innerhalb 1 bis 2 Millivolt mit den gefundenen überein, was besonders für die Kette mit HCl als eine gute Leistung der Methode bezeichnet werden muß. Auf diese Weise ergaben sich folgende Potentiale für die freie Diffusion. In der Tabelle III sind daneben die theoretisch berechneten Werte des Diffusionspotentials angegeben. Die Berechnung ist unter der Voraussetzung gemacht, daß die Elektrolyte total dissoziiert sind und die Überführungszahl der einzelnen Ionen unabhängig

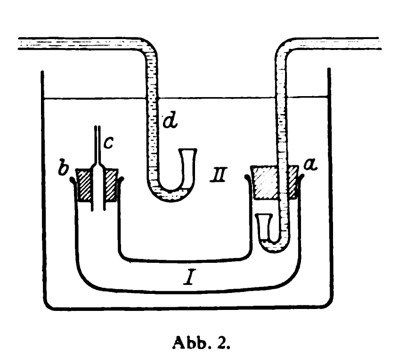


Abb. 2.

[1]) Bei Ketten mit Laugen muß der Gummistopfen vermieden werden. Man läßt dann das Glasrohr selbst am linken Ende in der Abbildung kapillar enden.

Tabelle III.

Überall wurde der Potentialunterschied einer 0,1 äquivalentnormalen Lösung des Elektrolyten gegen eine 0,01 n Lösung derselben Elektrolyten gemessen.

I	II		III									
	Diffusionspotentiale bei freier Diffusion		Membranpotentiale bei									
			Hülse A			Hülse B			Hülse C		Hülse D	
Salze	berechnet	gefunden	1 Am 15. Jan. 1925	2 Am 22. Januar	3 Am 23. Januar	1 Am 15. Januar	2 Am 22. Januar	3 Am 23. Januar	1 Am 22. Januar	2 Am 23. Januar	1 Am 22. Januar	2 Am 23. Januar
KCl	— 0,4	0	+ 10	+ 6	+ 10	+ 15,5	+ 9	+ 14	+ 7	+ 5	+ 10	+ 6,4
			+ 10,5			+ 14						
NaCl	— 11,6	— 10	+ 0,5	+ 2		+ 4,5	+ 6		— 3		0	
LiCl	— 18,8	— 15			— 4			+ 2		— 10		— 7
NH_4Cl	— 0,67	+ 1,5			+ 9,5			+ 11		+ 7		+ 8
$CaCl_2$	— 19,9	— 18	— 13	— 14		— 7,5	— 10,5		— 19		— 16	
$BaCl_2$	— 18,3	— 15, — 19, Mittel — 17			— 13			— 9,5		— 18		— 15,5
$MgCl_2$	— 22,5	— 21			— 17,5			— 11		— 20		— 18
$AlCl_3$	— 28,7	— 25	— 23	— 23		— 16,5	— 18,3		— 25,3		— 23	
$CeCl_3$		— 22			— 21			— 17		— 25		— 22
HCl	+ 38,0	+ 36	+ 39,5	+ 37		+ 41,3	+ 36		+ 37,5		+ 39	
KJ	— 0,84	+ 1			+ 12,3			+ 14		+ 8,7		+ 9,5
KBr	— 1,06	0			+ 11,5			+ 16		+ 6		+ 8
K_2CO_3	+ 12,7	+ 12			+ 31			+ 35,5		+ 28		+ 28,5
K_2SO_4	+ 13,4	+ 15	+ 29	+ 27,5		+ 33	+ 32		+ 26		+ 28,3	
K_2-Oxalat	+ 15	+ 15			+ 31			+ 36		+ 28,3		+ 29,5
K_3-Ferricyanid		+ 22	+ 35	+ 35		+ 40	+ 38,5		+ 33		+ 34	
NaOH	— 34,6	— 32,0			— 14			— 12		— 18		— 18,3

von ihrer Konzentration sei. Für die Beweglichkeit wurden die Werte nach *Kohlrausch* und *Heydweiller* aus *Landolt-Börnsteins* Tabellen[1] für unendliche Verdünnung angesetzt. Das Diffusionspotential wurde nach der Formel berechnet:

$$E = 0{,}058 \frac{\frac{u}{\gamma} - \frac{v}{a}}{u + v} \log \frac{c_1}{c_2},$$

wo u die Beweglichkeit, γ die Wertigkeit des *Kations* und v bzw. a das entsprechende für das *Anion* bedeutet, und c_1 und c_2 die Konzentrationen der beiden Lösungen sind.

Die Übereinstimmung zwischen den beobachteten und berechneten Werten bei den freien Diffusionspotentialen ist befriedigend in Anbetracht des Umstandes, daß die Formel nur angenähert zutrifft, indem sie voraussetzt, daß die Beweglichkeiten der Ionen von der Konzentration unabhängig seien, und daß sie die Konzentrationen statt der thermodynamischen Aktivitäten benutzt.

Wenn wir nun die freien Diffusionspotentiale mit den Membranpotentialen vergleichen, so finden wir, daß bei Anwesenheit der Membran die verdünntere Lösung stets positiver ist als bei freier Diffusion. (Tab. IV.)

Tabelle IV.

Differenz der Membranpotentiale gegen die Diffusionspotentiale bei der freien Diffusion.

Salze	Hülse A			Hülse B			Hülse C		Hülse D	
	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2
KCl	+10 +10,5	+ 6	+10	+15,5 +14	+ 9	+14	+ 7	+ 5	+10	+ 6,4
NaCl	+10,5	+12		+14,5	+16		+ 7		+10	
LiCl			+11			+17		+ 5		+ 8
NH_4Cl			+ 8			+ 9,5		+ 5,5		+ 6,5
$CaCl_2$	+ 5	+ 4		+11,5	+ 7,5		— 1		+ 2	
$BaCl_2$			+ 4			+ 7,5		— 1		+ 1,5
$MgCl_2$			+ 3,5			+10		+ 1		+ 3
$AlCl_3$	+ 2	+ 2		+ 8,5	+ 6,7		— 0,3		+ 2	
$CeCl_3$			+ 1			+ 5		— 3		0
HCl	+ 3,5	+ 1		+ 5,3	0		+ 1,5		+ 3	
KJ			+11,3			+13		+ 7,7		+ 8,5
KBr			+11,5			+16		+ 6		+ 8
K_2CO_3			+19			+23,5		+16		+16,5
K_2SO_4	+14	+12,5		+18	+17		+11		+13,3	
K_2-Oxalat			+16			+21		+13,3		+14,5
K_3-Ferricyanid	+13	+13		+18	+16,5		+11		+12	
NaOH			+18,0			+20,0		+14,0		—13,7

[1]) *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 5. Aufl., 2. 1104. Berlin 1923.

Der Unterschied Δ zwischen dem Potential bei freier Diffusion und bei Membrandiffusion ist aber bei verschiedenen Elektrolyten verschieden. Wenn wir die Chloride der verschiedenen Kationen miteinander vergleichen, so bemerken wir, daß Δ am größten ist bei einwertigen Alkaliionen, aber sehr klein beim H-Ion. Wenn wir die Alkalisalze verschiedener Anionen vergleichen, so steigt Δ bei mehrwertigen Anionen größer als bei einwertigen. Der theoretisch denkbare Maximalwert von 58 Millivolt, welcher eintreten würde, wenn die Membran für eine Ionenart ganz undurchlässig wäre, wird niemals auch annähernd erreicht, und das steht in Übereinstimmung mit der Erfahrung, daß die Pergamentmembran für keines der gewöhnlichen Ionen wirklich undurchlässig ist. Der Sinn des Potentials ist stets der, daß die Durchlässigkeit für das Anion vermindert erscheint. Die Deutung dieser Erscheinung kann nur die sein, daß die Beweglichkeit des Kations innerhalb der Membran relativ vergrößert oder die des Anions relativ verkleinert wird im Vergleich zur freien Diffusion. Der Effekt ist also prinzipiell derselbe wie bei der Apfelschale, nur kleiner. Da hier ein Lipoid und eine freie Fettsäure nicht in Betracht kommt und die Stromleitung überhaupt nicht durch die Substanz der Membran, sondern durch ihre Poren vermittelt wird, ist es nicht möglich, den *Beutner*schen Mechanismus für die Änderung der Permeabilität anzunehmen. Es muß sich vielmehr um ein kapillarelektrisches Phänomen handeln, dessen Deutung erst auf Grund anderer Versuchsanordnungen versucht werden soll.

Der soeben nachgewiesene Unterschied der Durchlässigkeit einer toten Membran für Anionen und Kationen muß notwendigerweise zur Folge haben, daß die Diffusion der Elektrolyte durch Membranen hindurch verschieden sein muß von der freien Diffusion. In der Tat ist es durch die Untersuchungen von *Voigtländer*, *Morse*, *Pierce*, *Bechhold*, *Ziegler*, *Meyer*, *Oeholm*, *Herzog* und *Polotzky*, *Fürth*, *Bubanović*, *Bauer*, *Piesch*, *Bethe*, *Terada*[1]) bekannt, daß die Membranen einen bedeutenden Einfluß auf die Diffusion gelöster Stoffe ausüben. Ferner steht die von *Bethe* und *Toropoff*[2]) gefundene sogenannte Neutralitäts-

[1]) *Voigtländer*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **3**, 316, 1889; *Morse* und *Pierce*, ebenda **45**, 589, 1903; *Bechhold* und *Ziegler*, ebendaselbst **56**, 105, 1906; *Kurt Meyer*, Hofmeisters Beitr. **7**, 393, 1905; *Oeholm*, Meddel. Vetensk. Akad. Nobelinstitut **2**, Nr. 30, 1913; *Herzog* und *Polotzky*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **87**, 449, 1914; *Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 376, 1912; *Fürth* und *Bubanović*, diese Zeitschr. **90**, 265, 1918; **92**, 139, 1918; *Fürth*, *Bauer* und *Piesch*, ebenda **110**, 29, 1919; *Bethe*, diese Zeitschr. **127**, 18, 1922; *Terada*, Zeitschr. f. phys. Chem. **109**, 199, 1924.

[2]) *Bethe* und *Toropoff*, Zeitschr. f. physik. Chem. 88, 686, 1914; **89**, 597, 1915.

störung zu beiden Seiten einer Membran bei Durchgang eines elektrischen Stromes in engem Zusammenhang mit dieser Beobachtung; auch diese wird von den Autoren darauf zurückgeführt, daß die Beweglichkeit des Anions und des Kations innerhalb der Membranporen anders sind als in freier wässeriger Lösung.

Zusammenfassung.

Wenn man zwei verschieden konzentrierte Lösungen eines Elektrolyten durch eine Pergamentmembran voneinander trennt, so ist die Potentialdifferenz zwischen den Lösungen verschieden von der bei freier Berührung der Lösung entstehenden Potentialdifferenz. Der Sinn der Änderung ist stets derart, als ob die Beweglichkeit des Anions relativ zu der des Kations verkleinert würde. Der Membraneffekt bei variierten Kationen nimmt mit der Wertigkeit des Kations *ab* und ist am größten bei einwertigen Kationen, mit Ausnahme des H-Ions, welches fast gar keinen Effekt hat. Wenn man die Anionen variiert, so ist umgekehrt der Effekt bei mehrwertigen Anionen größer als bei einwertigen.

Zur Mikromethodik der quantitativen Bestimmung der Hirnlipoide.

Von

Henriette Gorodissky.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des medizinischen Instituts zu Charkow und aus der biochemischen Abteilung des Instituts für experimentelle Medizin zu Leningrad.)

(Eingegangen am 10. März 1925.)

Eine Reihe von Untersuchungen wurde dem Studium des normalen chemischen Bestandes des menschlichen und tierischen Gehirns gewidmet (*Thudichum, Fränkel, Linnert, Petrovsky, Slowtzoff, Danilewski, Schkarin, Halliburton, Lenz, Abderhalden* und *Weil, Tomihide Schimizu* u. a.). Man erforschte die Veränderungen, die im Gehirn unter der Einwirkung der seine Funktion steigernden und herabsetzenden Stoffe auftreten (*Soula, Escande* und *Soula, Faure* und *Soula, Winterstein, Winterstein* und *Hecker, Winterstein* und *Hirschberg*). Die pathologische Chemie des Gehirns, dessen höchste psychische Tätigkeit gestört war, wurde bereits zur Untersuchung herangezogen (*Pighini, Pighini* und *Barbieri, Carbone* und *Pighini, Woskressenski, Basia Messing* u. a.).

Ob und worin ein Zusammenhang zwischen den psychischen und chemischen Vorgängen, die sich im Gehirn abspielen, besteht — das ist die Frage, die sich die Psychochemie aufwirft. Es ist möglich, daß verschiedene psychische Vorgänge nur bei Anwesenheit bestimmter chemischer Bestandteile des Hirngewebes möglich sind. Die graue und die weiße Substanz, das Großhirn, das Rückenmark und das Kleinhirn, die Gehirnrinde und die Ganglien, die verschiedene Funktionen ausüben, unterscheiden sich auch voneinander nach ihrem Gehalt an Wasser, Eiweiß, Lipoiden und Salzen (*Thudichum, Halliburton, Koch, Petrowski, Lenz, Fränkel* und *Dimitz, Slowtzoff* und *Georgiewskaja, Linnert, Kirschbaum* und *Linnert* u. a.). Das Gehirn der verschiedenen Tiere ist durch seinen besonderen Lipoidgehalt charakterisiert (*Linnert*). Bei den herangewachsenen Individuen desselben Geschlechts bleibt der chemische Hirnbestand hinsichtlich seines Lipoidgehaltes, seiner Masse, Eiweiße und Wassergehalts ziemlich beständig, verändert sich aber mit dem Alter (*Linnert*). Das noch nicht ausgebildete Säuglingsgehirn besteht hauptsächlich aus den in Aceton löslichen Stoffen (Cholesterin), während bei dem erwachsenen Menschen die ungesättigten

Phosphatide das Übergewicht haben (*Schiff* und *Stransky, Faerber*). Die gesamte Eiweißmenge des Gehirns wächst bis zum reifen Alter an (*Schkarin*). Die psychischen Erkrankungen, wie Dementia praecox, Paralysis progressiva usw. werden stets von vollkommen bestimmten, nur für diese Krankheiten typischen Veränderungen im chemischen Hirnbestande begleitet (*Pighini, Pighini* und *Carbone*).

Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen chemischen Hirnbestandteile und die Chemie des Gehirns selbst wäre nur dann möglich, näher zu erforschen, wenn es gelingen würde festzustellen, daß die bestimmten funktionellen Hirnstörungen den beständigen Änderungen im Gehalt und der Gruppierung dieser chemischen Substanzen entsprechen. Eine experimentell hervorgerufene Verstärkung der Nervensystemtätigkeit (feuchte und trockene Wärme, Diathermie, Faradisation, Asphyxie, Curare, Strychnin, Cocain, Ammoniumsalze) hat eine gesteigerte N-Dissimilation in direktem Verhältnis zur Folge, die sich in einer vergrößerten Aminogenese und bei Autolyse in einer Zunahme der N-Polypeptide und N-Aminosäuren äußert. Die die Hirntätigkeit schwächenden Stoffe, wie Alkohol, Chloroform, Chloralose, Äther, werden von einem entsprechenden Eiweißkörperabbau begleitet (*Soula, Faure* und *Soula, Escaude* und *Soula, Hirschberg* und *Winterstein*). Bei elektrischer Erregung des überlebenden Froschgehirns steigt der Phosphorumsatz im Vergleich zu dem eines in Ruhe befindlichen Gehirns beinahe um das Doppelte, die Narkose (Urethan) setzt ihn dagegen in den meisten Fällen um 33 proz. herab (*Hecker*).

Alle hier kurz erwähnten Arbeiten weisen zwar entschieden auf die wichtige Bedeutung der chemischen Vorgänge bei der Lebenstätigkeit der Nervenzelle hin, allein sie geben keine Antwort auf die Frage über die Rolle, die diesen Prozessen bei ihrer spezifischen neuro-psychischen Tätigkeit zukommt. Die meisten dieser Untersuchungen wurden mit der gesamten Hirnsubstanz oder mit der gesamten grauen Substanz durchgeführt. Eine derartige Methode, die funktionelle Bedeutung der verschiedenen chemischen Hirnbestandteile zu ermitteln, konnte aber nur zu der Zeit angewandt werden, als die Lehre von der Einheitlichkeit der Hirnfunktionen noch Geltung hatte und man lokalisierte Felder mit Spezialfunktionen noch nicht anerkannte. Ist aber jedem Bezirk der Hirnrinde eine besondere Funktion eigen, *so darf man a priori auch eine verschiedene Struktur dieser Bezirke und vielleicht auch verschiedene chemische Vorgänge während ihrer Tätigkeit voraussetzen. Daraus folgt, daß das Studium der chemischen Statik und chemischen Dynamik des Gehirns nur nach der topographischen Einteilung seiner Funktion erfolgen soll.* Es ist die Menge der stickstoffhaltigen Stoffe, der Lipoide und Mineralsubstanzen in den verschiedenen Bezirken ein und desselben Gehirns zu vergleichen, um dadurch einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und einer bestimmten Funktion feststellen zu können; die chemischen Bestandteile desselben Bezirks im gesunden und kranken Gehirn, ferner in einem Gehirn, das sich in Ruhe befand, und einem, das intensiv gearbeitet hat, sind zu vergleichen, um so festzustellen, ob das Ansteigen oder Absinken auch der spezifischen Veränderung des Chemismus im Hirngewebe entspricht; die chemischen Bestandteile ein und desselben Hirnbezirks und ihre Veränderungen bei experimentell hervorgerufener Tätigkeit sind bei verschiedenen Tieren mit spezifisch ausgebildeter Psychik, oder bei einem heranwachsenden, sich allmählich ausbildenden Gehirn zu vergleichen, um dadurch aufklären zu können, ob ein Zusammenhang zwischen dem Charakter der chemischen

Vorgänge und der Vervollkommnung der Nervenzelltätigkeit besteht[1]). Alles dies sind die zunächst zu lösenden Aufgaben der Psychochemie. Die pathologischen Gehirne der Nervenkranken und die Tierversuche bieten hierfür ein breites Arbeitsgebiet.

Allein selbst im menschlichen Gehirn nehmen die einzelnen Felder mit Spezialfunktionen so unbeträchtliche Gehirnrindenbezirke ein, daß die von dort entnommene graue Substanz nur Bruchteile von Grammen beträgt. Ein Arbeiten mit so kleinen Mengen erfordert vor allem die Ausarbeitung einer Mikromethode für die quantitative Trennung und Bestimmung der verschiedenen Eiweiß- und Lipoidsubstanzen.

Der auffallende Reichtum des Hirngewebes an Lipoiden, ihre Mannigfaltigkeit, die Anwesenheit einer großen Menge ungesättigter Phosphatide, all das legte den Gedanken nahe, daß von allen chemischen Bestandteilen die Lipoide die spezifischen Hirnelemente sind. In einer Reihe von Arbeiten wurde der normale Lipoidbestand des Gehirns untersucht (*Thudichum, Fränkel, Linnert, Petrowsky, Slowtzoff, Koch, Schiff* und *Stransky* u. a.), einzelne Lipoide wurden isoliert und ihre Eigenschaften beschrieben (*Thudichum, Vauquellin, Thierfelder, Falk, Fränkel, Linnert, Levene* u. a.), ferner liegen auch Arbeiten über die pathologischen Gehirne vor (*Pighini, Pighini* und *Carbone, Faerber, Halliburton, Ederer, Fachini* u. a.). Dieses Interesse an den Lipoiden und die gleichzeitige Schwierigkeit der Untersuchung infolge ihrer Mannigfaltigkeit und geringer Beständigkeit veranlaßte die Forscher, Methoden zur quantitativen Bestimmung der Hirnlipoide auszuarbeiten und zu vervollkommnen.

Die ersten quantitativen Bestimmungen der Organlipoide bestanden darin, daß diese möglichst vollständig mit Äther und Alkohol extrahiert wurden. Man vereinigte die Extrakte und berechnete die Phosphatidmenge auf P und N (*Hoppe-Seyler*) oder auf die Abbauprodukte des Lecithins (*Heffter*). Die weitere Trennung der Phosphatide wurde im allgemeinen nach zwei Methoden ausgeführt:

1. Trennung mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel und 2. Fällung in Form von Metallverbindungen (eine eingehende Kritik dieser Methoden erschien von *I. Bang*, Best. d. Zelllipoide, Ergebn. d. Phys. 1907).

Der erste Autor, der den quantitativen Hirnlipoidbestand systematisch erforscht hat, war *Petrowsky*: Er extrahierte sorgfältig die zerriebene Hirnsubstanz während 24 Stunden mit kaltem Alkohol; der Rückstand wurde mit Äther extrahiert und alsdann der ätherunlösliche Rest mit 95 proz. Alkohol ausgekocht. Der nach dem Verdunsten des ersten Alkoholauszuges gebliebene Rückstand wurde mit entwässertem Äther extrahiert. Schließlich gewann *Petrowsky*:

1. kalten Alkoholextrakt,
   a) in wasserfreiem Äther unlösliche Stoffe,
   b) in wasserfreiem Äther lösliche Substanzen (wurden mit dem folgenden Extrakt vereinigt).
2. Ätherextrakt, in welchem das Lecithin auf P berechnet wurde. Das übrige wurde für Cholesterin + Fett (?) gehalten.

---

[1]) Derartige experimentelle Forschungen und Untersuchungen der chemischen Topographie der Großhirnrinde wurden schon im Laboratorium für physiologische Chemie des staatlichen medizinischen Instituts zu Charkow aufgenommen.

3. Heißer Alkoholextrakt. Nach Abzug des Lecithins war es möglich, hierin die Cerebrinmenge zu bestimmen.
4. Der aus Asche und Eiweiß bestehende Rückstand.

Später wandte *Thudichum* dieselben Lösungsmittel an, indem er das Gehirn zuerst mit kaltem Alkohol, darauf mit kaltem Äther, kochendem Äther und schließlich mit siedendem Alkohol behandelte, oder er verfuhr in entgegengesetzter Reihenfolge, indem er die Hirnsubstanz mit Alkohol extrahierte und die alkoholische Lösung sowie den Alkoholrückstand mit heißem Äther behandelte. Auf diese Weise isolierte er:

1. nur in Äther lösliche Substanzen,
2. nur in Alkohol lösliche Substanzen.

Zur weiteren Trennung dieser Stoffe verwandte er $CdCl_2$, $PtCl_4$, essigsaures Blei und Ammoniak.

Die wichtigsten hier angeführten Methoden der chemischen Analyse des Nervengewebes beruhen auf ein und demselben Prinzip: der Extraktion *der gesamten* Lipoidmenge, und darauf erst deren weiterer Trennung und Bestimmung.

Der Entwicklungsfortschritt jeder Experimentalwissenschaft befindet sich in enger Abhängigkeit von den jeweiligen Untersuchungsmethoden. Bei der Psychochemie können wir dasselbe feststellen. Seit der Veröffentlichung der durch *Fränkel* und seine Schüler ausgearbeiteten Methodik der quantitativen Hirnlipoidtrennung hat jedoch die Lipoidchemie große Fortschritte gemacht. Die Eigentümlichkeit der erwähnten Methode besteht darin, daß die Lipoide nicht in ihrer Gesamtheit extrahiert, sondern nach einzelnen Gruppen durch die Extraktion getrennt werden. Da das in großer Menge im Gehirn vorhandene Cholesterin die Löslichkeit der einzelnen Lipoide in den verschiedenen Lösungsmitteln beträchtlich verändert, so entfernt *Fränkel* vor allem aus dem Gehirn das Cholesterin durch Extraktion mit Aceton. In die das Cholesterin enthaltende Acetonlösung geht nur das eine von den Phosphatiden — das Leucopoliin — mit über. Mittels weiterer Extraktionen durch Petroläther, Benzol, Alkohol und Äther gewann *Fränkel* die ungesättigten Phosphatide (Petroläther), die gesättigten Phosphatide und die Cerebroside. Der Acetonextrakt wird getrennt, indem man das Cholesterin mit Hilfe von Digitonin nach *Windaus* fällt, oder indem man die Chlorcadmiumverbindung des Leucopoliins darstellt. Das Cephalin (+ Galaktosid) gewinnt man als Niederschlag durch Fällung des Petrolätherextrakts mit Alkohol. Die Lösung wird nunmehr mit Blei behandelt; nach der Ätherextraktion erhält man in der Lösung die Lecithinbleiverbindung, im Niederschlag die Myelinbleiverbindung. Gegenwärtig gilt diese Methode als die beste und für die vergleichende Analyse geeignetste (*Slowtzoff* und *Georgiewskaja, Pighini*).

Da unsere Absicht dahin geht, die chemischen Bestandteile der einzelnen Hirnbezirke zu erforschen, können wir leider diese Methodik,

die allgemeinen Anklang gefunden hat, nicht anwenden, weil sie große Mengen von Hirnsubstanz erfordert. *Fränkel* untersuchte auf einmal 100 kg, *Pighini* nahm für die Untersuchung von 568 bis 1110 g, *Kirschbaum* und *Linnert* verwandten für die Cholesterinbestimmung nach dieser Methode Mengen von 23 bis 49 g usw. Wenn man gezwungen ist, mit Bruchteilen von Grammen, ja sogar mit Milligrammen zu arbeiten, ist die *Fränkel*sche Methode unanwendbar, daher hatten wir uns mit der Ausarbeitung einer Mikromethode zu befassen.

Die Methode der quantitativen Hirnlipoidbestimmung soll folgenden Forderungen Genüge tun:

1. Die für die Bestimmung angewandte Menge soll so gering sein, daß man sie ohne Schwierigkeiten bei der Untersuchung des kleinen, dem bestimmten physiologischen Zentrum entsprechenden Rindenbezirks entnehmen kann.

2. Infolge der Unbeständigkeit der Lipoide muß das Verdunsten schnell ohne Anwendung irgendwelcher grober physikalischer oder chemischer Hilfsmittel erfolgen.

3. Die Hirnsubstanz soll sich in einem derartigen Zustande befinden, der die Möglichkeit einer leichten Lipoidextraktion zuläßt.

4. Die verschiedenen Lipoidgruppen sollen einzeln mit hinreichender Genauigkeit, möglichst einfach, ohne Anwendung kostspieliger und heutzutage schwer erhältlicher Reagenzien, getrennt werden.

Die einem bestimmten Bezirk der Rinde, Ganglien usw. entnommene Hirnsubstanz wird in einem kleinen Mörser zu einem völlig gleichmäßigen Brei zerrieben. Darauf wird die zerkleinerte Substanz mit Hilfe derselben kleinen Mörserkeule auf ein Stückchen dichten Filtrierpapiers in gleichmäßigen Schichten aufgelegt. Diese Blättchen, deren Größe etwa 15×20 mm beträgt, werden vor dem Gebrauch durch Extraktion mit kochendem Alkohol entfettet; am besten ist es, sich auf einmal einen großen Vorrat solcher Blättchen herzustellen. Nachdem das gewogene Blättchen *auf einer Seite* mit einer dünnen Schicht der zerriebenen Hirnsubstanz bedeckt worden ist, wird es wiederum gewogen und auf diese Weise das Gewicht der angewandten Hirnsubstanzmenge ermittelt. Für gewöhnlich nimmt man 40 bis 60 mg. Es bedarf nur geringer Übung, um stets fehlerlos die nötige Menge auf das Papier zu bringen; weniger als 30 mg sollen nicht gebraucht werden. Die Wägung erfolgt am einfachsten und schnellsten mit der Torsionswage von *Hartmann* und *Braun*. Dafür kann man die Wage mit einem Meßbereich von 1 bis 500 mg, wobei jeder Skalenteilstrich gleich 1 mg ist, benutzen. Auf dieser Wage sind dann die

Milligrammdrittel nach Augenmaß abzulesen. Selbstverständlich kann man auch eine gewöhnliche analytische Wage gebrauchen, wenn die Blättchen in diesem Falle in Wägegläschen mit eingeschliffenen Glasstopfen hineingebracht werden.

Nachdem die Gehirnmenge auf dem Blättchen abgewogen ist, wird dieses auf der Spitze einer stählernen Stecknadel befestigt, nach dem Vorschlag von *J. Bang* in seiner Methode der Bestimmung des trockenen Blutrückstandes. Man bohrt mit gewöhnlichen stählernen Stecknadeln ein Korkplättchen durch und setzt auf die Stecknadelspitze das Papierchen mit der gewogenen Hirnmenge. Auf das Plättchen neben jeder Stecknadel schreibt man Nummern der Reihe nach; das Papierchen mit der Hirnmenge wird im Protokoll unter der entsprechenden Nummer bezeichnet. Das Korkplättchen mit dem Papierchen wird in den Exsikkator hineingestellt. Nach 30 bis 40 Minuten wird die Gehirnsubstanz hinreichend trocken sein und das Blättchen kann für die Lipoidextraktion herausgenommen werden. Man kann aber die auf diese Weise getrocknete Hirnsubstanz auch für längere Zeit im Exsikkator liegen lassen. Ein so rasches Austrocknen im Exsikkator bei Zimmertemperatur verändert natürlich die empfindlichen Lipoide nicht; die dünne Hirnsubstanzschicht auf dem porösen Filtrierpapier ist der Extraktion leicht zugänglich.

Nachdem das Blättchen von der Stecknadelspitze befreit worden ist, wird es der Länge nach umgebogen, so daß es die Form eines aufgeschlagenen Buches annimmt, und ins Reagenzglas hineingebracht. Selbstverständlich darf das Papierchen nur mit trockenen Händen berührt werden.

Für die Extraktion werden die gewöhnlichen Reagenzgläser von ungefähr gleichem Durchmesser angewandt, damit der Kühlerstopfen paßt (siehe unten). Nur die *sehr sorgfältig entfetteten und absolut trockenen Reagenzgläser* sind gebrauchsfähig. Nachdem man das Papierchen bis auf den Boden des Reagenzglases gesenkt hat, wird es mit der abgemessenen Menge des Lösungsmittels übergossen. Bei den gewöhnlichen Größen der Reagenzgläser sind 6 ccm des Lösungsmittels ausreichend, um das ganze Papierchen zu versenken und die Flüssigkeitshöhe, nach *I. Bangs* Vorschrift in seinen „Mikromethoden", um 2 bis 3 mm über dem Papierchen zu erhalten. Das Reagenzglas wird auf den Kühlerstopfen aufgesetzt. Ein kleiner, gewöhnlicher Kühler, dessen Länge 15 bis 20 cm beträgt, wird senkrecht an dem Stativ befestigt, derart, daß man die Möglichkeit hat, durch das Drehen der Schraube den ganzen Kühler nach Belieben senken und heben zu können. Der Korkstopfen (niemals ein Gummistopfen) muß zuvor mit siedendem Alkohol ausgekocht sein. Der Reagenzglasboden berührt das auf den Dreifuß gelegte Drahtnetz. Das Reagenzglas wird mittels eines kleinen

Spirituslämpchens erhitzt. Um ein mögliches Entflammen des leicht entzündlichen Lösungsmittels zu vermeiden, empfiehlt es sich, den Dreifuß mit einem Drahtnetz zu umwickeln. Wird das Reagenzglas vor der Operation aufmerksam betrachtet, so erfolgt diese Entflammung niemals. Da die Extraktion mit dem kochenden Lösungsmittel nur 10 Minuten dauert, so genügt dieser kleine, senkrecht aufgestellte Kühler vollkommen, um die entstehenden Dämpfe abzukühlen.

Nach erfolgter Extraktion wird das Spirituslämpchen zur Seite geschoben, man hebt den Kühler etwas, nimmt das Reagenzglas ab und holt das Blättchen mit Hilfe eines Platinhäkchens heraus, stellt es ins folgende Reagenzglas hinein und gießt je nach Bedarf mit demselben oder mit dem darauffolgenden Lösungsmittel über. Nach Belieben kann man die weitere Behandlung für eine gewisse Zeit aufschieben; in diesem Falle setzt man das Papierchen auf die Stecknadel mit der betreffenden Nummer und stellt es in den Exsikkator zurück.

Da sich die gesamte aus dem Gehirn extrahierte Lipoidmenge nach Gruppen sehr schwer trennen läßt, lag es nahe, die von *Fränkel* angewandte allmähliche Lipoidextraktion mit Aceton, Petroläther und Alkohol vorzunehmen. Um die Extraktionsmenge der gebrauchten Hirnmenge beurteilen zu können, wurde die mit einem Lösungsmittel extrahierte Lipoidmenge durch Oxydation mit Chromsäure nach *Bang* bestimmt.

Wie bekannt, besteht diese Bestimmungsmethode hauptsächlich in folgendem:

Das mit Blut durchtränkte Papierchen wird mit Petroläther oder Alkohol extrahiert; nachdem das Lösungsmittel möglichst gänzlich verjagt worden ist, gießt man zum Rückstande 1 ccm 1proz. NaOH hinzu, kocht bis zum völligen Verschwinden des Lösungsmittelgeruchs auf und fügt nach Abkühlung 1 ccm n/10 $K_2Cr_2O_7$ (oder n/1, n/2, n/5, je nach der vorhandenen Lipoidmenge) und 5 ccm konzentrierter H_2SO_4 hinzu; nach 15 Minuten wird der gesamte Reagenzglasinhalt quantitativ mittels 100 bis 150 ccm Wasser in einen Erlenmeyerkolben übergeführt, dann gießt man 2 ccm 10proz. KJ hinzu und titriert mit n/10 $Na_2S_2O_3$ (Stärkelösung als Indikator). Die in ccm n/10 $Na_2S_2O_3$ ausgedrückte Differenz („Chromat-Index“ = Chr. Ind.) zwischen der angewandten Chromsäuremenge und der verbrauchten Menge Hyposulfit läßt auf die Menge der extrahierten Lipoide schließen.

Um festzustellen, wievielmal die verwendete Hirnmenge bis zu ihrer völligen Erschöpfung mit Aceton extrahiert werden soll, haben wir sie wiederholt im Laufe von 5 Minuten mit 6 ccm kochenden Acetons extrahiert, in jedem Extrakte wurden die Lipoide, wie oben erwähnt, bestimmt. Wir führen folgende zwei Versuche an (Tabelle I):

Tabelle I.

Versuch 1.				Versuch 2.			
Nr.	Zeit der Extraktion	Reduktion d. Chromsäure in ccm n/10 $Na_2S_2O_3$	*Liebermann*sche Reaktion	Nr.	Zeit der Extraktion	Reduktion d. Chromsäure in ccm n/10 $Na_2S_2O_3$	*Liebermann*sche Reaktion
1	5′	3,15	positiv	1	5′	6,80	positiv
2	5	0,35	schwach positiv	2	5	0,65	„
3	5	0,25	negativ	3	5	0,35	negativ
4	5	0,20	„	4	5	0,16	„
5	5	0,15	„	5	5	0,20	„
6	5	0,20	„	6	5	0,20	„
				7	5	verloren	
				8	2h bei 15°C	0,35	„
				9	18h bei 15°C	0,40	„

Auf diese Weise wurde ermittelt, daß die Hauptmenge der Lipoide in den ersten und in den zweiten, teilweise in den dritten Extrakt übergeht. Bei weiterer Extraktion geht ungleichmäßig nur noch eine geringe Lipoidmenge in die Acetonlösung über. Analoge Befunde haben auch *Slowtzoff* und *Georgiewskaja* bei Gehirnextraktion nach *Fränkel* erhalten, daher sind sie der Ansicht, daß die Extraktion nach *Fränkel* sich über einen ganz bestimmten Zeitraum erstrecken soll.

Es wurde nun versucht, die Extraktion in 6 ccm kochenden Acetons während 10 Minuten auszuführen. Hier erwies es sich, daß die Hauptmenge der Lipoide in den ersten Extrakt übergeht, der zweite unterscheidet sich aber durchaus nicht vom dritten, vierten usw. (Tabelle II).

Tabelle II.

Versuch 1.				Versuch 2.			
Nr.	Zeit der Extraktion	Menge der reduzierten Chromsäure in ccm n/10 $Na_2S_2O_3$	*Liebermann*sche Reaktion	Nr.	Zeit der Extraktion	Menge der reduzierten Chromsäure in ccm n/10 $Na_2S_2O_3$	*Liebermann*sche Reaktion
1	10′	5,95	positiv	1	10′	5,10	positiv
2	10	0,10	negativ	2	10	0,20	negativ
3	10	0,15	„	3	10	0,20	„
				4	10	0,20	„

In keinem Falle (von 14 Versuchen) war bei der zweiten Extraktion die *Liebermann*sche Reaktion auf Cholesterin positiv, während sie bei 5 Minuten dauernder Extraktion in den ersten zwei Extraktionen, und einmal sogar in der dritten positiv war.

Wir entschlossen uns, die Extraktion mit 6 ccm kochenden Acetons während 10 Minuten auszuführen; darauf übergossen wir dasselbe Blättchen zur Ausspülung wiederum mit 6 ccm Aceton und erhitzten bis zum Sieden. Darauf wurde das Papierchen herausgenommen und

beide Extraktionen vereinigt. Um den angenommenen bestimmten Zeitraum zu prüfen, extrahierten wir verschiedene Mengen desselben Gehirns und berechneten den „Chromatindex" pro 100 mg der feuchten Substanz. Wir nahmen absichtlich bald die graue, bald die weiße Substanz, bald ein Gemenge der beiden. Wie aus der nachfolgenden Tabelle III zu ersehen ist, erhält man bei einer derartigen Extraktion ziemlich übereinstimmende Resultate. Hier werden einige zufällig ausgewählte Fälle angeführt.

Tabelle III.

Nr.	Hirnmenge in mg	„Chromatindex" pro 100 mg der feuchten Substanz	Nr.	Hirnmenge in mg	„Chromatindex" pro 100 mg der feuchten Substanz
1	36,0	8,22	3	48,3	7,55
	34,0	8,64		41,7	7,63
	42,5	8,58	4	55,0	16,73
2	38,5	21,78		45,3	16,71
	40,7	21,96		49,5	16,50
	50,3	22,02		53,7	16,72
	39,0	21,85	5	61,0	8,49
	60,0	21,91		54,7	8,91
				38,3	8,34

Durch derartige Versuche gelang es auch festzustellen, daß für die völlige Extraktion der verwendeten Hirnmenge mit Petroläther 15 Minuten genügen; für die darauffolgende Extraktion der gesättigten Phosphatide und Cerebroside extrahiert man 10 Minuten mit 6 ccm kochenden Alkohols, dann noch einmal mit derselben Menge während 5 Minuten. Im weiteren verfährt man mit den extrahierten Lipoiden verschieden, je nach der zu bestimmenden Lipoidgruppe.

I. Die Acetonextraktion. Das gesamte Hirncholesterin und auch einige Phosphatide (Leucopoliin) gehen in diesen Extrakt über. Der erste Gedanke war, die Lipoidgesamtmenge dieses Extraktes mittels Titration nach *I. Bang* zu bestimmen; darauf das Cholesterin mit Digitonin zu fällen, die übriggebliebene Lipoidmenge auch nach *Bang* zu bestimmen und die Differenz nach der Cholesterinmenge zu berechnen. Aber, wie wir bereits bewiesen haben[1]), wird der Oxydationskoeffizient des Cholesterins sowie auch anderer Lipoide in Abhängigkeit von der zur Oxydation gebrauchten Stoffmenge beträchtlich verändert, z. B.:

Bei der Oxydation von:

0,0484 mg Cholesterin ist der Koeffizient = 2,69
0,5036 „ „ „ „ „ = 2,14
1,2000 „ „ „ „ „ = 1,74
2,3040 „ „ „ „ „ = 1,27

[1]) Wratschebnoje Djelo Nr. 8/9, 1924.

Unter solchen Umständen kann man natürlich nicht auf Grund der reduzierten Chromsäuremenge auf die Cholesterinmenge schließen.

Für die Cholesterinbestimmung erwies sich die auf der *Liebermann*schen Farbenreaktion beruhende kolorimetrische Methode als geeignet. Es ist sehr bequem, in Glasröhrchen gleichen Durchmessers von 10 bis 20 ccm Weite, mit Teilungen in 0,1 ccm und mit eingeschliffenen Glasstopfen zu kolorimetrieren. Die Cholesterinbestimmung wird auf folgende Weise ausgeführt:

Nach der Gewinnung des Acetonextrakts der verwendeten Hirnmenge verjagt man das Aceton durch Erwärmen auf dem Sandbade, indem man ein Überhitzen sorgfältig vermeidet. Zu dem absolut trockenen Rückstand gießt man 3 ccm Chloroform hinzu und läßt 5 Minuten stehen; dann gießt man 1 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konzentrierter H_2SO_4 hinzu und läßt für 15 Minuten bei 32°C stehen. Zum Vergleich gebraucht man eine auf dieselbe Weise ebenso behandelte Cholesterinlösung, die 0,5 mg Cholesterin in 3 ccm Chloroform enthält. Beim Kolorimetrieren ist es bequem mit dem Gemisch von Chloroform und Essigsäureanhydrid im Verhältnis 3 : 1 zu verdünnen.

Als Beispiel der Cholesterinbestimmung unter Anwendung dieser Methode führen wir folgende Tabelle IV an.

Tabelle IV.

Cholesterin in mg		Fehler	Cholesterin in mg		Fehler
berechnet	gefunden	Proz.	berechnet	gefunden	Proz.
0,200	0,201	+ 0,5	0,500	0,499	— 0,2
0,200	0,203	+ 1,5	0,550	0,545	— 0,9
0,250	0,245	— 2,0	0,600	0,610	+ 1,7
0,250	0,253	+ 1,2	0,600	0,611	+ 1,8
0,300	0,301	+ 0,3	0,600	0,598	— 0,4
0,300	0,305	+ 1,7	0,700	0,690	— 1,4
0,400	0,405	+ 1,2	0,750	0,751	+ 0,1
0,450	0,440	— 2,2	0,750	0,756	+ 0,8
0,450	0,450	0	0,750	0,745	— 0,7
0,450	0,458	+ 1,7	0,750	0,748	— 0,3

II. Petrolätherextraktion. Der nach der Acetonextraktion der Hirnlipoide erhaltene Rückstand wird nach *Fränkel* mit Petroläther behandelt. In diesen Extrakt gehen alle ungesättigten Phosphatide und ein Galaktosid über. Wie der Versuch ergeben hat, geht bei der Extraktion der so geringen Hirnmengen von 40 bis 60 mg mit einer verhältnismäßig so großen (6 ccm) Acetonquantität in diesen ersten Extrakt auch ein Teil der Stoffe über, die bei der Hirnbehandlung nach *Fränkel* nur bei der darauffolgenden Petroläther- und Alkoholextraktion gelöst werden. Da es von Interesse war, die ganze Gruppe der ungesättigten Phosphatide in Betracht zu ziehen, so waren wir genötigt,

die angewandte Hirnmenge mit niedrig siedendem (50 bis 60° C) Petroläther ohne vorherige Behandlung mit Aceton zu extrahieren. In diesem Falle gehen in den Petroläther alle ungesättigten Phosphatide, einschließlich das Leucopoliin (bei *Fränkel* ist das Leucopoliin im Acetonextrakt), Cholesterin und ein Galaktosid über. Die Menge der ungesättigten Phosphatide ist am besten nach dem P-Gehalt in diesem Extrakt zu bestimmen.

Die quantitative Phosphorbestimmung wird mittels der von *Bell-Doisy* ausgearbeiteten kolorimetrischen Methode für die P-Bestimmung im Blute nach der *Briggs*schen Modifikation ausgeführt.

Für diese Bestimmung sind folgende Reagenzien nötig:

1. *Molybdänsäure.* Man löst 25 g des molybdänsauren Ammoniaks in 300 ccm H_2O und 200 ccm verdünnter H_2SO_4.

2. *Hydrochinonlösung.* 0,5 g Hydrochinon in 100 ccm Aqua dest. + 1 Tropfen konzentrierter H_2SO_4.

3. *Sulfitlösung,* frisch dargestellte 20proz. Natriumsulfitlösung.

4. *Monokaliumphosphatlösung,* die in 1 ccm 0,025 mg P enthält.

Die Phosphorbestimmung besteht in folgendem: Man gießt 5 ccm der zu untersuchenden (eiweißfreien) Lösung in einen Meßzylinder oder in einen Meßkolben von 10 ccm Inhalt, fügt 2 ccm Molybdänsäurelösung, 1 ccm Sulfitlösung und 1 ccm Hydrochinonlösung hinzu und füllt bis zu 10 ccm mit Wasser auf. Die Färbung erreicht ihr Maximum nach Verlauf einer Stunde. Für den Vergleich im Kolorimeter gebraucht man 1 ccm der Standardlösung von KH_2PO_4, die auf dieselbe Weise ebenso behandelt wurde.

Da wir leider keine Möglichkeit hatten, uns mit den Arbeiten von *Bell-Doisy* und *Briggs* im Original bekannt zu machen, so mußten wir uns nach Referaten der *Briggs*schen Arbeit richten. Aber als wir den Phosphor in dieser Weise bestimmten, erwies es sich, daß die nach 1 Stunde auftretende blaue Färbung für das Kolorimetrieren zu blaß war, und außerdem bildeten sich nicht völlig entsprechende Schattierungen, die bald grünlich, bald rein blau waren, was natürlich das Kolorimetrieren sehr erschwerte und es beinahe unmöglich machte. Auch wurden, ungeachtet des Hinweises darauf, daß das Färbungsmaximum nach 1 Stunde erreicht ist, die für einige Stunden fortgestellten Bestimmungen bedeutend dunkler, wobei die Farbe von hellblau in intensiv blau überging. Unter solchen Bedingungen verstärkte sich aber die Färbung nicht genau im Verhältnis zur P-Menge. Die Temperaturschwankungen im Laboratorium hatten auch einen beträchtlichen Einfluß auf die Färbung.

Nachdem wir den Gang der Phosphorbestimmung etwas verändert hatten, gelang es uns, eine blaue, der Intensität nach für das Ver-

gleichen im Kolorimeter nach *Dubosq* ganz geeignete Färbung zu gewinnen, die in strenger Abhängigkeit von der P-Menge sich veränderte und dabei immer die gleichen Schattierungen behielt. Die Veränderung bestand darin, daß nach Beigabe aller Reagenzien zum untersuchenden Stoffe (wie oben angeführt), alle Kölbchen oder Reagenzgläser für 3 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden alle Kölbchen gleichzeitig in ein Bad mit kaltem Wasser gebracht. Nach der Abkühlung wird im Kolorimeter nach *Dubosq* kolorimetriert, in dem die Flüssigkeitssäule der Standardlösung auf 10 mm festgestellt ist.

Man berechnet nach der Formel: $x = \frac{0{,}025 . 10}{a}$ mg. a ist die Kolorimeterangabe.

Wir führen einige nach dieser Methode ausgeführte Phosphorbestimmungen an (Tabelle V):

Tabelle V.

P in mg		Fehler	P in mg		Fehler
berechnet	gefunden	Proz.	berechnet	gefunden	Proz.
0,0125	0,012 70	+ 1,6	0,0375	0,036 80	— 1,87
0,0125	0,012 30	— 1,6	0,0375	0,038 01	+ 1,36
0,0175	0,017 35	— 0,85	0,0400	0,040 22	+ 0,55
0,0175	0,017 84	+ 1,94	0,0400	0,040 85	+ 2,12
0,0225	0,022 72	+ 0,96	0,0400	0,039 30	— 1,7
0,0225	0,023 01	+ 2,27	0,0450	0,046 00	+ 2,22
0,0225	0,022 02	— 2,13	0,0450	0,045 80	+ 1,77
0,0325	0,031 65	— 2,30	0,0500	0,050 44	+ 0,88
0,0350	0,035 50	+ 1,43	0,0500	0,050 18	+ 0,36
0,0375	0,036 92	— 1,5	0,0500	0,051 21	+ 2,4
			0,0500	0,049 70	— 0,6

Für die Bestimmung des organisch gebundenen Phosphors ist man genötigt, den Stoff zunächst der Verbrennung zu unterwerfen und in der übriggebliebenen Asche den Phosphorgehalt zu bestimmen. Die Verbrennung ist folgendermaßen auszuführen: Den gesamten Petrolätherextrakt der angewandten Hirnmenge bringt man in einen kleinen Tiegel, fügt 3 Tropfen 10proz. Na_2CO_3 hinzu, verdampft bis zur Trockne auf einem erwärmten Sandbade und verbrennt dann. Der Rückstand wird quantitativ unter Verwendung von 5 ccm destillierten Wassers in ein Reagenzglas mit Marke bei 10 ccm Volumen übergeführt. Man fügt alle notwendigen Reagenzien hinzu und verfährt wie oben erwähnt. Beispielsweise führen wir einige Phosphorbestimmungen im Lecithin und Kephalin an. Wir bereiteten eine Kephalinlösung von solcher Konzentration, daß 1 ccm — 0,0258 mg P enthielt (57,4 mg Kephalin in 100 ccm Petroläther) und eine Lecithinlösung mit

0,0349 mg P in 1 ccm (88,5 mg Lecithin in 100 ccm Alkohol). Jeder Wert ist das Resultat von zwei bis drei Parallelbestimmungen (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Kephalin.			Lecithin.		
Lösung	P in mg		Lösung	P in mg	
ccm	berechnet	gefunden	ccm	berechnet	gefunden
0,5	0,0129	0,0131	0,4	0,0140	0,0137
1,0	0,0258	0,0255	0,8	0,0279	0,0277
1,5	0,0387	0,0383	1,2	0,0419	0,0420
2,0	0,0516	0,0521	1,6	0,0558	0,0561

Die vollkommene Unlöslichkeit des Kephalins in absolutem Alkohol ermöglicht es, in demselben Petrolätherextrakt auch die *Kephalingruppe* einzeln zu bestimmen. Die angewandte Hirnmenge wird mit Petroläther extrahiert und der Petroläther so lange verdunstet, bis auf dem Boden nur 2 bis 3 Tropfen übriggeblieben sind. Zu dem Rückstand fügt man 2,0 bis 2,5 ccm absoluten Alkohols hinzu und läßt alles einige Stunden (über Nacht) stehen. Unterdessen bildet sich ein geringer, aber deutlich wahrnehmbarer Kephalinniederschlag. Jetzt filtriert man alles durch ein kleines aschefreies Filter, indem man das Filtrat unmittelbar in den Tiegel sammelt. Das Reagenzglas und das Filter werden mit 2 ccm Alkohol ausgewaschen. Der Alkohol wird verdunstet, der Rest verascht und in der Asche P bestimmt, wie oben erwähnt. In dieser Weise bestimmt man die P-Menge aller ungesättigten Phosphatide mit Ausnahme des Kephalins. Da die P-Menge aller ungesättigten Phosphatide und der P der Phosphatide ohne Kephalin bekannt ist, so ist es leicht, den P-Gehalt des Kephalins und daraus das Kephalin in Milligrammen zu berechnen.

Zur Prüfung nahmen wir eine Kephalin- und Lecithinlösung von solcher Konzentration, daß 1 ccm 0,03035 mg P enthielt, wovon 0,01745 mg auf Kephalin und 0,01290 mg P auf Lecithin zu beziehen waren (28,7 mg Kephalin und 44,25 mg Lecithin in 100 ccm Petroläther gelöst). Die Tabelle VII kann als Beispiel solcher Kephalinbestimmung dienen.

Tabelle VII.

Lösung	P des Kephalins in mg	
ccm	gefunden	berechnet
0,4	0,0070	0,00698
0,8	0,0138	0,01396
1,2	0,0208	0,02094
1,6	0,0280	0,02792

III. Die Alkoholextraktion. Die mit Petroläther extrahierte Hirnsubstanz wird nach dem Verdunsten mit Alkohol behandelt. In diesen Auszug geht die Gruppe der gesättigten Phosphatide und Cerebroside über. Zu ihrer Bestimmung benutzt man die Methode der Oxydation mittels Chromsäure, aber wie wir schon mitgeteilt haben[1]) — bei der Oxydation der Lipoide nach *I. Bang* mittels Chromsäure — schwanken die Oxydationskoeffizienten in weiten Grenzen in Abhängigkeit von der für die Oxydation benötigten Stoffmenge. So ist zum Beispiel bei der Oxydation von

0,0446 mg	Cerebrosid	der	Koeffizient	= 2,30
0,3720 „	„	„	„	= 1,62
1,4136 „	„	„	„	= 1,14

Daher galt es, solche Bedingungen auszuarbeiten, unter denen die Oxydation der Lipoide mittels Chromsäure gleichmäßig vor sich gehen würde, nicht beeinflußt von der Menge des zu oxydierenden Stoffes. In derselben Arbeit gelang es uns festzustellen, daß beim Erhitzen der Lipoide während 2 Stunden in stark siedendem Wasserbade mit einem Chromsäuregemisch die Oxydationskoeffizienten aller einzelnen Stoffe ziemlich konstant bleiben. Bei der Oxydation der gesamten Alkoholextraktion (nach *S. Fränkel*) ist der Koeffizient = 2,85.

Die bei der Alkoholextraktion gelöste Lipoidmenge wird auf folgende Weise quantitativ bestimmt:

Nachdem der Alkohol durch Erhitzen auf einem Sandbad verjagt ist, gießt man zum Rückstand 1 ccm 1proz. NaOH hinzu und kocht *bis zu völligem Verschwinden des Alkoholgeruchs*. Nach dem Abkühlen fügt man 5 ccm der zuvor bereiteten Chromsäuremischung hinzu (1 g $K_2Cr_2O_7$ pro 100 ccm konzentrierter H_2SO_4) und erhitzt 2 Stunden lang auf siedendem Wasserbad. Nach Verlauf dieser Frist werden alle Reagenzgläser gleichzeitig herausgenommen und in ein Bad mit kaltem Wasser gestellt. Dann führt man den Inhalt des Reagenzglases mittels 100 bis 150 ccm destillierten Wassers in einen Erlenmeyerkolben von 250 ccm Inhalt über, fügt 2 ccm 10proz. KJ hinzu und titriert mit n/10 $Na_2S_2O_3$ (Indikator — 1 Proz. Stärkelösung). Als Kontrolle dient eine Blindanalyse.

Berechnung. Man zieht von der Zahl (a) der beim Titrieren der Kontrollbestimmung verbrauchten Kubikzentimeter n/10 $Na_2S_2O_3$. die Zahl (b) der Kubikzentimeter n/10 $Na_2S_2O_3$, die beim Titrieren der Versuchslösung verbraucht wurde, ab und dividiert die Differenz ($a - b$), die der Menge Kubikzentimeter reduzierter n/10 Chromsäure entspricht, durch den

[1]) Wratschebnoje Djelo Nr. 8/9, 1924.

Faktor 2,85 und erhält nun in Milligrammen die Menge der Lipoide der Alkoholextraktion: der Cerebroside und der gesättigten Phosphatide.

$$\frac{a - b}{2,85}.$$

Die folgende Tabelle VIII gibt die chemischen Bestandteile einiger nach oben erwähnter Methode untersuchten Gehirne wieder. Die Werte bezeichnen den Bestand der einzelnen Gehirne, sind aber keineswegs die Durchschnittswerte für die Gehirne der Tiere der betreffenden Art im allgemeinen.

Tabelle VIII.

	Cholesterin	P d. ungesättigten Phosphatide	Cerebroside u. gesättigte Phosphatide
	in Proz. der frischen Substanz		
Gehirnrinde des Menschen .	1,20	0,0522	2,5
„ „ „ .	1,16	0,0504	2,4
„ „ Kaninchens	1,17	0,0577	2,96
„ „ „	1,32	0,0588	2,85
„ „ Ochsen . .	1,51	0,0534	2,80

Die vorliegende Methode der quantitativen Bestimmung der Hirnlipoide in kleinen Mengen leidet an einer Reihe von Mängeln, wie z. B. die Bestimmung der ungesättigten Phosphatide nach *P* die summarische Bestimmung der Lipoide der Alkoholextraktion. Die Methodik erfordert eine weitere Ausarbeitung, sie kann aber auch in dieser Form für das Studium der Biochemie des Gehirns in der von uns angegebenen Richtung, nämlich für das Studium der chemischen Bestandteile und der funktionellen Änderungen des Gehirns oder der Rinde nicht im ganzen, sondern eines jeden einzelnen Bezirks angewandt werden.

Herrn Prof. Dr. *Alexander Palladin* spreche ich meinen aufrichtigen Dank aus.

Literatur.

E. Abderhalden und *Weil*, Zeitschr. f. phys. Chem. **81**, 207, 1912. — *Dieselben*, ebendaselbst **88**, 1913. — *I. Bang*, Ergebn. d. Phys. 1907, S. 181. — *Derselbe*, Mikromethoden der Blutanalyse 1922. — *Basia Messing*, Dissertation Zürich 1912. — *Bell-Doisy*, Journ. of biol. Chem. **44**, 1920. — *Briggs*, ebendaselbst **58**, 1922; referiert nach Ber. d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **19**, 1923. — *Dimitz*, diese Zeitschr. **28**, 295, 1910. — *Escaude* et *Soula*, C. r. de la Soc. d. Biol. **74**, 878, 1913. — *Fachini*, Bull. d. science med. **10**, 82, 1922. — *Faerber*, Jahrb. f. Kinderheilk. **98**, 307, 1922. — *Falk*, diese Zeitschr. **60**, 187, 1909. — *Faure* et *Soula*, C. r. de la Soc. d. Biol. **74**, 350, 1913. — *Fleischer*, Russk. Wratsch. Nr. 12, 1908. — *S. Fränkel*, diese Zeitschr. **19**, 254, 1909. — *Derselbe*, Ergebn. d. Phys. 1909, S. 212. — *Halliburton*, ebendaselbst **4**, 1905. — *Hecker*, Zeitschr. f. phys. Chem. **129**, 26, 1923. — *Kirschbaum* und *Linnert*, diese Zeitschr. **46**, 253, 1912. —

Koch, Stud. of Rockfell.-Inst. **8**. — *Derselbe*, Journ. of biol. Chem. **15**. 422, 1913. — *Derselbe*, Journ. of exper. Med. **18**, 1911. — *Lenz*, Russk. physiol. Journ. **2**, 1919. — *Levene* and *Rolf*, Journ. of biol. Chem. **54**. 91 und 99, 1922. — *Levene* and *Simms*, ebendaselbst **51**, 285, 1922. — *K. Linnert*, diese Zeitschr. **24**, 268, 1910. — *Derselbe*, ebendaselbst **26**. 44, 1910. — *Noll*, Zeitschr. f. phys. Chem. **27**, 370, 1899. — *Petrowsky*, Pflügers Arch. **7**, 367, 1873. — *Pighini* und *Carbone*, diese Zeitschr. **46**. 450, 1912. — *G. Pighini*, ebendaselbst **68**, 304, 1914. — *Derselbe*, ebendaselbst **118**, 231, 1921. — *Derselbe*, La Biochemica d. cervello 1915. — *Serono* und *Palozzi*, Arch. di Farmacol **11**, 556. — *Schiff* und *Stransky*, Jahrb. f. Kinderheilk. **96**, 245, 1921. — *Schimizu*, diese Zeitschr. **117**, 252. 1921. — *Soula*, C. r. de la Soc. Biol. **64**, 297, 1912. — *Derselbe*, Journ. d. Phys. et Path. **15**, 171, 1913. — *Schkarin*, Dissertation St. Petersburg 1902. — *Slowtzoff* und *Georgiewskaja*, Russk. physiol. Journ. **4**, 35, 1922. — *Smith* and *Mair*, Journ. of Path. and Bact. **16**, 131, 1911. — *Thierfelder*, Zeitschr. f. phys. Chem. **89**, 248, 1914. — *Derselbe*, ebendaselbst **91**, 107. 1914. — *Thudichum*, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere 1901. — *Windaus*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **42**, 1909. — *Winterstein* und *Hecker*, Zeitschr. f. phys. Chem. **128**, 302, 1923. — *Winterstein* und *Hirschberg*, ebendaselbst **100**, 185, 1917. — *Dieselben*, ebendaselbst **101**, 212, 1918. — *Dieselben*, ebendaselbst **105**, 1, 1919. — *Woskressensky*, ebendaselbst **89**, 228, 1914.

Über die Chinasäure verwertenden Pilze und Bakterien.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des staatlichen Timirjazeff-Forschungsinstituts, Moskau.)

(Eingegangen am 19. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei unseren in einer vorangegangenen Mitteilung[1]) erörterten Versuchen konnten wir zeigen, daß die Entwicklung der Pilze auf Chinasäure stets von der intermediären Bildung von Benzolderivaten, und zwar Protocatechusäure und Brenzcatechin begleitet wird, und daß den Pilzen, die nicht imstande sind, diese Umwandlung zu vollziehen, gleichzeitig auch die Fähigkeit abgeht, die Chinasäure als eine Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Unter den Pilzen der letzteren Kategorie haben wir *Mucor racemosus* näher untersucht und festgestellt, daß dieser Pilz unfähig ist, die Chinasäure in die betreffenden Phenolverbindungen zu verwandeln und auf derselben zu gedeihen. Später konnten wir uns davon überzeugen, daß dieselben Verhältnisse auch bei den Hefearten anzutreffen sind, die diesem *Mucor* hinsichtlich ihres Stoffwechsels nahestehen, wobei sich die Ergebnisse *Bokornys*[2]) bestätigen ließen, daß die Chinasäure der Hefe nicht als Kohlenstoffnahrung dienen kann.

Bei unseren Versuchen wurden zwei Weinhefearten, *Frohberg* und *Logos*, geprüft[3]). Die Hefen gediehen mit chinasaurem Natrium und Ammoniumsalzen, als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, weder auf flüssigem Nährboden noch auf Agar. Auf denselben Nährböden fand aber eine gute Entwicklung statt, nachdem Zucker zugesetzt worden war. Bei der Einwirkung der auf dem Zuckernährboden aufgezogenen Hefe auf die Lösung von chinasaurem Natrium ließ sich die Bildung der die Farbreaktion mit Eisenchlorid gebenden Phenolverbindungen

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, 442, 1924.

[2]) *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **47**, 191 und 301, 1917.

[3]) Die Ergebnisse *Th. Bokornys* beziehen sich auf Bierhefe.

nicht nachweisen, wenn auch die Versuche im Thermostaten bei einer Temperatur von 30^0 wochenlang dauerten. War aber der Lösung eine geringe Menge des Mycels von *Citromyces glaber* zugesetzt worden, so trat eine ganz deutliche Färbung schon am nächsten Tage auf.

Derselbe Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Organismen, auf der Chinasäure zu gedeihen einerseits, und diese Säure in die betreffenden Phenolverbindungen zu verwandeln andererseits, trat auch bei einer Reihe von Bakterien in Erscheinung, die von uns[1]) auf den Chinasäurenährböden aus verschiedenen Quellen isoliert wurden und von denen weiter unten noch zu sprechen sein wird.

Aus allen soeben angeführten Angaben läßt sich schließen, daß der Übergang von Chinasäure zu Phenolderivaten eine physiologisch wichtige, intermediäre Umwandlung darstellt, durch welche die Chinasäure den sie verwertenden Organismen zugänglich wird.

Dieser Schluß stimmt nicht mit der gegenwärtig in der Pflanzenphysiologie herrschenden Anschauung überein, daß die hydrierten Benzolderivate eine bessere Kohlenstoffquelle für Pflanzenorganismen darstellen als die Benzolverbindungen selbst, die man überhaupt für Nährstoffe von geringerem Werte zu halten pflegt. So finden wir darüber bei *Fr. Czapek* in seiner „Biochemie der Pflanzen" folgende Sätze:

„Man kann behaupten, daß bei Phenolen und Phenolsäuren die Eignung mit der Zahl der OH-Gruppen im allgemeinen wächst, und daß hydroaromatische Verbindungen ungleich besser wirken als nichthydrierte Benzolderivate"[2]). — „Wichtig ist es, daß Hydrobenzolderivate viel besser als Nährstoffe taugen, als die ungesättigten zyklischen Verbindungen. Inosit wirkt für Bakterien als guter Nährstoff, und verschiedene Pilze nutzen Chinasäure und Quercit als gute Kohlenstoffquellen aus. Man kann daraus schließen, daß bei der Spaltung von Benzolderivaten im Stoffwechsel öfters partielle Hydrierung vorausgehen mag und hydrierte Benzolderivate leichter spaltbar sind, als nichthydrierte carbozyklische Verbindungen"[3]).

Wie aus unseren Versuchen ersichtlich ist, kommt bei der Ausnutzung der Chinasäure durch die Pilze eine gerade umgekehrte Erscheinung zur Geltung, und zwar eine vorausgehende Dehydrierung der hydrierten carbozyklischen Verbindung. Die Ansicht, daß „Hydrobenzolderivate viel besser als Nährstoffe taugen, als die ungesättigten zyklischen Verbindungen", läßt sich überhaupt nicht als hinreichend begründet anerkennen, da die Bedeutung der Konzentration bei der vergleichenden Schätzung des Nährwertes von verschiedenen Verbindungen ungenügend beachtet wurde. Der Einfluß der Konzentration tritt besonders in bezug auf die Verbindungen hervor, die giftige Eigen-

[1]) Von mir und von *W. W. Perwozwansky*, vgl. weiter unten.
[2]) *Fr. Czapek*, Biochemie der Pflanzen **1**, 387, 1913.
[3]) Derselbe, ebendaselbst **3**, 445, 1921.

schaften bei höheren Konzentrationen aufweisen können. Viele Benzolderivate gehören gerade zu solchen Verbindungen, und man kann sich deshalb über ihren Nährwert eine richtige Vorstellung nur bei Anwendung derjenigen Konzentrationen machen, bei denen ihre giftige Wirkung noch nicht zum Vorschein kommt.

Noch *Naegli* und *Pfeffer* wiesen darauf hin, daß einige Phenole und aromatische Säuren, die bei einer gewissen Konzentration giftig sind, bei entsprechender Verdünnung ihrer Lösungen den Mikroorganismen als Kohlenstoffnahrung dienen können.

Die Bedeutung der Konzentration bei der vergleichenden Prüfung des Nährwertes von Kohlenstoffverbindungen wurde aber besonders von *Waterman*[1]) hervorgehoben. Durch seine Versuche mit *Penicillium glaucum* zeigte er für eine Reihe von Phenolen und Oxybenzoesäuren, daß viele von diesen mehr oder weniger gut als Kohlenstoffquelle von dem Pilz verwertet werden können, wenn die Konzentration unter eine gewisse Grenze herabgesetzt wird. Aus den Angaben *Watermans* ist außerdem ersichtlich, daß der Nährwert der Polyphenole und ihrer Carbonsäuren nicht nur durch die Zahl, sondern auch durch die relative Verteilung von Hydroxylgruppen im Benzolring bestimmt wird.

Dasselbe ergibt sich auch aus den weiter unten angeführten Ergebnissen unserer Versuche mit den Pilzkulturen auf verschiedenen Polyphenolen. Von besonderem Interesse ist aber die durch diese Versuche festgestellte Tatsache, daß gewisse Polyphenole bei geeigneten niedrigeren Konzentrationen weder der Chinasäure, noch auch den Zuckerarten im Nährwert nachstehen.

Vergleichende Versuche mit den Pilzkulturen auf Polyphenolen, Chinasäure und Zucker.

In diesen Versuchen trat Brenzcatechin als ein übliches Umwandlungsprodukt der Chinasäure bei ihrer Verwertung durch die Pilze in den Vordergrund des Interesses[2]). Die Lösungen von 1 Proz. Gehalt an Brenzcatechin sind für die Pilze stark giftig. In solchen Nährlösungen findet nicht nur gar keine Entwicklung statt, sondern auch ein rasches Absterben der vorher auf Zucker aufgezogenen Pilzdecken, was sich durch eine bald auftretende, dem abgestorbenen Mycel eigentümliche Kontraktion derselben nachweisen läßt. Die übrigen geprüften Polyphenole werden von den Pilzen in viel höheren Konzentrationen als Brenzcatechin vertragen.

---

[1]) *H. J. Waterman*, Centralbl. f. Bakt. (2) **42**, 639, 1915.

[2]) Die ein Hauptprodukt dieser Umwandlung bildende Protocatechusäure stand nicht zu unserer Verfügung, und deshalb konnte sie nicht bei den Versuchen geprüft werden. Protocatechusäure scheint von den Pilzen in viel höheren Konzentrationen als Brenzcatechin vertragen zu werden. Auf 1 proz. Lösung dieser Säure konnte *Waterman* (l. c.) noch ein ziemlich gutes Wachstum von *Penicillium glaucum* beobachten.

Bei den weiter unten folgenden Versuchen wurden die geprüften Verbindungen in den Konzentrationen von 0,03 bis 0,5 Proz. zur Anwendung gebracht. Die Kulturen enthielten stets je 50 ccm Nährlösung.

Versuchsreihe 1.

In dieser Versuchsreihe wurde das Wachstum von *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* auf Rohrzucker, Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon und Pyrogallol mit demselben Prozentgehalt der Nährlösungen an diesen Verbindungen der vergleichenden Prüfung unterzogen. Die angewandten Nährlösungen enthielten je 0,1 Proz. der genannten Kohlenstoffverbindungen und außerdem 0,05 Proz. NH_4NO_3 und 0,1 Proz. Salze (mit Zink). Die Kulturen von *Aspergillus niger* wurden im Thermostaten bei 30° und die von *Citromyces glaber* bei Zimmertemperatur von etwa 20° stehengelassen.

Am besten, besonders bei *Aspergillus niger*, entwickelte sich die Pilzdecke in der Kultur auf Brenzcatechin. Am zweiten Tage nach der Impfung bildete sich hier eine ziemlich dichte, weiße Decke. In dieser Kultur entstanden die Conidien später und spärlicher als in der Zuckerkultur; in der letzteren war aber die Decke bedeutend schwächer und lockerer. Auf den anderen Phenolen verlief die Entwicklung anfangs etwas langsamer als auf Zucker, später wuchsen aber die Pilzdecken ebenso wie auf Zucker, und zum Schlusse des Versuchs standen sie diesen in ihrer Entwicklung nicht nach. Nach einer Woche wurden die Kulturen durch Erhitzen im *Koch*schen Sterilisator abgetötet, die Pilzdecken von der Kulturflüssigkeit abgetrennt, getrocknet und gewogen.

Tabelle I.

Pilzdeckengewicht in Milligrammen auf 50 ccm Nährlösung.

	Aspergillus niger	*Citromyces glaber*
Mit 0,1 Proz. Rohrzucker	13,7	12,3
„ 0,1 „ Brenzcatechin	19,0	18,7
„ 0,1 „ Resorcin	13,9	14,9
„ 0,1 „ Hydrochinon	16,0	14,3
„ 0,1 „ Pyrogallol	11,3	13,9

Die weiter unten folgenden Versuche wurden mit *Aspergillus niger* angestellt.

Versuchsreihe 2.

In dieser Versuchsreihe wurden die Kulturen auf den bei den vorigen Versuchen geprüften Phenolen und außerdem noch auf Dextrose, Lävulose, Chinasäure und Phloroglucin aufgestellt. Die Kohlenstoffverbindungen wurden in drei verschiedenen Konzentrationen für die Kulturen angewandt, die in der Tabelle angegeben sind. Die Entwicklung des Pilzes auf den verschiedenen Verbindungen gab im allgemeinen dasselbe Bild wie in der vorigen Versuchsreihe. Bei niedrigeren Konzentrationen wuchs der Pilz am besten auch hier auf Brenzcatechin, und auf Chinasäure zeigte er eine fast ebenso gute Entwicklung wie auf Zuckerarten. Auf der 0,5proz. Lösung

von Brenzcatechin trat gar keine Entwicklung, sogar keine Keimung zutage, auch dann nicht, wenn dieser Nährlösung Zucker zugesetzt worden war. In dieser Konzentration wirkte das Brenzcatechin giftig. Auf Phloroglucin fand nur Keimung der Conidien und Bildung von kleinen Mycelflocken statt; dieses Phenol war in den angewandten Konzentrationen ungiftig, es konnte dem Pilze aber nicht als Kohlenstoffnahrung dienen.

Die Kulturen auf der 0,1 proz. Lösung von Dextrose, Lävulose, Chinasäure und Brenzcatechin wurden in drei Serien aufgestellt, die nach 2, 5 und 9 Tagen der Analyse unterworfen wurden. Schon in der ersten Serie wurde der Zucker und das Brenzcatechin fast ganz verbraucht. In dieser Versuchsreihe wurden die Kulturen wie in der vorigen im Thermostaten bei 30° stehengelassen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Konzentration, Proz.	0,5	0,1			0,05
Kulturdauer, Tage	9	2	5	9	9
Mit Dextrose	74,0	13,7	15,0	13,8	6,7
„ Lävulose	78,5	14,3	15,1	15,3	7,7
„ Chinasäure	62,3	13,9	13,9	12,9	7,0
„ Brenzcatechin	0	19,0	19,7	18,7	9,7
„ Hydrochinon	70,0	—	—	15,5	8,2
„ Resorcin	65,8	—	—	16,1	8,5
„ Pyrogallol	48,5	—	—	10,7	6,2
„ Phloroglucin	0	—	—	0	0

Aus den angeführten Angaben ergibt sich, daß der relative Nährwert der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen bei den Konzentrationsveränderungen nicht beständig bleibt. Bei höheren Konzentrationen ernähren die Zuckerarten besser als die Phenole, bei niedrigeren verschiebt sich aber der Nährwert zugunsten der letzteren. Besonders deutlich kam diese Erscheinung bei Brenzcatechin zur Geltung.

Es war auffallend, daß die Pilzdeckengewichte auf Zucker und Brenzcatechin bei den in den vorliegenden Versuchen geprüften niedrigeren Konzentrationen fast umgekehrt proportional ihren Molekulargewichten waren. Daraus ging hervor, daß der molare Nährwert dieser Verbindungen unter den angegebenen Konzentrationen beinahe gleich ist, und dieser Schluß fand eine Bestätigung in den nachfolgenden Versuchen, bei denen *äquimolare Konzentrationen* angewandt wurden.

Versuchsreihe 3.

In dieser Versuchsreihe wurden die Kulturen von *Aspergillus niger* auf Dextrose, Chinasäure, Brenzcatechin und Dextrose + Brenzcatechin mit denselben Salzen, wie in den vorigen Versuchen, aufgestellt. Die Kohlenstoffverbindungen wurden in m/200 Lösungen angewandt. Man stellte je zwei Kulturen mit jeder Nährlösung auf und ließ die Kulturen 4 Tage im Thermostaten bei 30° stehen. Nach Verlauf dieser Zeit war der Zucker und das Brenzcatechin in allen Kulturen ganz verbraucht. Die Wägung der Pilzdecken ergab die folgenden Resultate.

Tabelle III.

Pilzdeckengewicht in Milligrammen auf 50 ccm Nährlösung.

	Serie 1	Serie 2	Durchschn.-Werte
Mit Dextrose, m/200, d. h. 0,09 proz. . . .	14,5	13,5	14,0
„ Chinasäure, m/200, d. h. 0,096 proz. . .	14,0	14,0	14,0
„ Brenzcatechin, m/200, d. h. 0,055 proz. .	13,0	13,0	13,0
„ Dextrose + Brenzcatechin (je m/200) .	27,5	27,0	27,2

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen entwickelten sich also die Pilzdecken auf den äquimolaren Lösungen der geprüften Substanzen beinahe gleich.

Versuchsreihe 4.

In dieser Versuchsreihe wurden äquimolare Dextrose- und Brenzcatechinlösungen von verschiedener Konzentration, und zwar m/40, m/80, m/160 und m/320 (mit den Salzen, wie in den vorigen Versuchen) geprüft. Die Kulturen in zwei Serien aufgestellt und bei der Temperatur von 27° stehengelassen. Die erste Serie, abgesehen von der Kultur mit m/40 Brenzcatechin, die keine Entwicklung und nur eine eben bemerkbare Conidienkeimung aufwies, wurde nach 2 Tagen, die zweite nach 4 Tagen und die soeben erwähnte Kultur der ersten Serie mit Brenzcatechin nach 7 Tagen der Analyse unterworfen. Dabei wurden die Gewichte der getrockneten

Tabelle IV.

Konzentration in Mol	1/40	1/80	1/160	1/320
Kulturen auf Dextrose	Kulturdauer 2 Tage			
Pilzdeckengewicht in mg	36,5	21,0	13,5	7,8
Reduktion mit *Fehling*scher Lösung in Kulturflüssigkeit . . .	stark	bedeutend	schwach	s. schwach
		Kulturdauer 4 Tage		
Pilzdeckengewicht in mg	69,5	35,0	16,8	8,2
Reduktion mit *Fehling*scher Lösung in Kulturflüssigkeit . . .	s. schwach	nicht vorhanden		
Kulturen auf Brenzcatechin	Kulturdauer 2 Tage			
Pilzdeckengewicht in mg	0	9,0	12,0	7,6
Färbung d. Kulturflüssigkeit mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3	—	stark	bedeutend	s. schwach
	Kulturdauer 4 Tage			
Pilzdeckengewicht in mg	34,5	27,7	15,0	8,6
Färbung d. Kulturflüssigkeit mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3	stark	s. schwach	nicht vorhanden	
	Kulturdauer 7 Tage			
Pilzdeckengewicht in mg	55,5	—	—	—
Färbung d. Kulturflüssigkeit mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3	nicht vorh.	—	—	—

Pilzdecken bestimmt und die Kulturflüssigkeiten auf restierenden Zucker bzw. Brenzcatechin mit *Fehling*scher Lösung bzw. mit Eisenchlorid und Soda geprüft. Alle Kulturen enthielten je 50 ccm Nährlösung. Die Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Die in der Tabelle angegebenen Pilzdeckengewichte sind auf Abb. 1 graphisch dargestellt.

In der Zuckerkultur sind die Pilzdeckengewichte den Konzentrationen fast genau proportional. Bei den höheren Konzentrationen wies Brenzcatechin schon eine hemmende Wirkung auf, die noch in

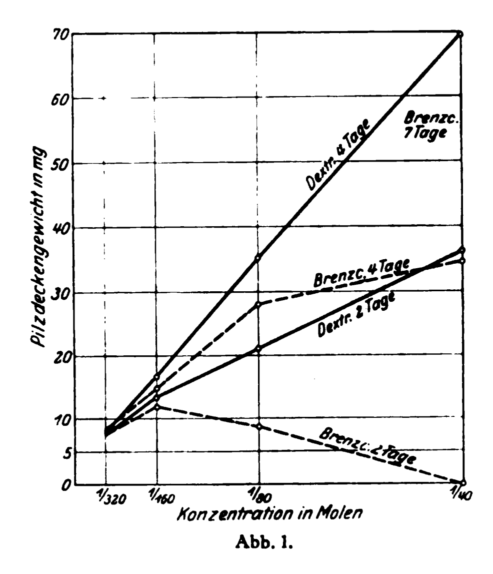


Abb. 1.

m/160 Lösungen bis zu einem gewissen Grade zutage trat. Auf m/320 Lösungen entwickelte sich der Pilz mit Brenzcatechin bereits ebensogut wie mit Zucker.

Dasselbe Bild haben wir auch in der folgenden Versuchsreihe, in der die Nährlösungen dieselbe Zusammensetzung hatten, wie bei den vorigen Versuchen, aber ohne Zink zur Anwendung kamen.

Versuchsreihe 5.

Es wurden je drei Kulturen auf Dextrose- und Brenzcatechinlösungen von verschiedenen Konzentrationen, und zwar m/80, m/160 und m/320 aufgestellt. Man ließ die Kulturen im Thermostaten bei 32° 2 Tage stehen und unterwarf sie dann der üblichen Analyse, deren Resultate weiter unten angegeben sind. Die Conidien waren in den Brenzcatechinkulturen schwächer entwickelt, als in den Zuckerkulturen, und dieser Unterschied nahm mit der Konzentration zu, was auch bei den vorigen Versuchen beobachtet werden konnte. Zum Schluß des Versuches waren Zucker und Brenzcatechin in allen Kulturen ganz verbraucht.

Tabelle V.

Pilzdeckengewicht in mg auf 50 ccm Nährlösung.

Konzentrationen in Molen	1/80	1/160	1/320
Mit Dextrose	33,2	16,2	8,6
„ Brenzcatechin	27,8	14,8	8,2

Aus unseren Versuchen sowie aus den oben erwähnten Beobachtungen *Watermans* ergibt sich, daß nicht nur die Zahl der Hydroxylgruppen, sondern auch ihre Verteilung im Benzolring für die Ausnutzung der Polyphenole durch die Pilze maßgebend ist. So ist das Phloroglucin in den geprüften Konzentrationen für die Pilze ganz unschädlich, jedoch wird es, im Gegensatz zu Pyrogallol und Diphenolen, von den Pilzen gar nicht oder fast gar nicht zur Nahrung verbraucht[1]), und die Diphenole taugen als Nährstoffe besser als Pyrogallol, obgleich dieses mehr Hydroxylgruppen als die ersteren enthält. Was die Diphenole betrifft, so erwies sich das Brenzcatechin, das bei höheren Konzentrationen (0,5 Proz.) am giftigsten wirkte, in schwächeren Lösungen als die beste Kohlenstoffquelle, und in geeigneter Konzentration übertraf es nicht nur Chinasäure, sondern auch Zucker. Im gegebenen Falle können die Giftigkeit und der Nährwert bis zu einem gewissen Grade in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen, indem sie durch dieselbe Ursache bedingt werden, die auf einer höheren Oberflächenaktivität hinsichtlich der Plasmabestandteile beruhen kann. Die Aktivität der zur Verfügung der Zelle stehenden Substanz führt zu einer narkotisierenden und tötenden Wirkung bei höheren Konzentrationen und beschleunigt die Ausnutzung der Substanz als eines Nährstoffs bei niedrigeren Konzentrationen. In der letzteren Beziehung muß die Oberflächenaktivität nicht allein die Aufnahme der Substanz durch die Zelle fördern, sondern auch die Verarbeitung im Protoplasma, da diese sich hauptsächlich an den Grenzoberflächen der Plasmaphasen zu vollziehen scheint[2]).

Bei niedrigeren Konzentrationen stehen die stark oberflächenaktiven Stoffe (ceteris paribus) in bezug auf die Aufnahme und die

[1]) Diese Ergebnisse für Phloroglucin stimmen mit denen von *Bokorny* überein, der auch keine Entwicklung von Mikroorganismen auf Phloroglucinnährlösungen beobachten konnte. *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **30**, 1911; **47**, 201, 1917. Nach *Waterman* (l. c.) wächst *Penicillium glaucum* auch auf diesem Phenol.

[2]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **119**, 134, 1921; *Wo. Ostwald*, Kolloid-Zeitschr. **33**, 356, 1923; *P. Girard* et *M. Platard*, C. r. **178**, 1393, 1924; *P. Girard*, ebendaselbst **178**, 1847, 1924; *J. Traube*, diese Zeitschr. **152**, 358, 1924; *E. Abderhalden* und *A. Fodor*, Fermentforsch. **1**, 533, 1916; *A. Fodor*, Fermentproblem 1922.

Kondensation an den Phasengrenzoberflächen unter günstigeren Bedingungen zur Verarbeitung und Ausnutzung von lebenden Zellen als die inaktiven Stoffe, für die der osmotische Druck von ausschlaggebender Bedeutung sein soll[1]). Der wichtige Vorzug der letzteren im Vergleich zu den ersteren besteht jedoch darin, daß sich jene in den Zellen in bedeutenden Mengen ohne Plasmabeschädigung anhäufen können. Die weite Verbreitung von Kohlehydraten im Pflanzenreich wird wahrscheinlich teilweise auch durch die soeben genannte Eigenart bedingt und nicht nur durch die besondere Fähigkeit dieser Verbindungen, als Material zum Aufbau der lebenden Zellen zu dienen.

Im Zusammenhang mit den oben angeführten Ergebnissen und Erwägungen verdienen einige Schlußfolgerungen von *Waterman* Beachtung, die in seiner schon zitierten Arbeit zu finden sind. Von seinen Beobachtungen über die Entwicklung von *Penicillium glaucum* auf Phenolen und Phenolsäuren ausgehend, kommt er zu dem Schluß, daß „eine niedrige Konzentration einer Verbindung, die in größeren Quantitäten schädlich wirkt, im allgemeinen eine raschere Entwicklung hervorruft als dieselbe Konzentration einer anderen, weniger schädlichen Verbindung". Diese Schlußfolgerung läßt sich freilich nicht zu weit verallgemeinern, aber sie scheint innerhalb bestimmter Grenzen in bezug auf diejenigen Stoffe Anwendung zu finden, die nach der Art ihrer Verarbeitung in der lebenden Zelle bis zu einem gewissen Grade chemisch analog sind.

Bei höheren Konzentrationen (0,1 bis 0,3 Proz.) — nach den Beobachtungen *Watermans* — entwickelte sich der Pilz ziemlich gut auf Gallus- und Protocatechusäure und gar nicht oder fast gar nicht auf p-Oxybenzoesäure; in schwächeren Lösungen verlief aber die Entwicklung auf der letzteren Säure besser als auf den zwei ersteren. Weiter ließ sich, nach *Waterman,* bei niedrigeren Konzentrationen, ein besseres Wachstum des Pilzes auf Phenol als auf p-Oxybenzoesäure beobachten, bei höheren Konzentrationen kehrte sich das Verhältnis um.

Dieselben Regelmäßigkeiten lassen sich auch in den Ergebnissen unserer Versuche bemerken, wenn man die Veränderungen im relativen Nährwert von Brenzcatechin und anderen Phenolen wie auch von Brenzcatechin und Zucker bei verschiedenen Konzentrationen verfolgt.

[1]) Es ist auch wohl möglich, daß die Giftigkeit und der Nährwert der Kohlenstoffverbindungen durch die chemische Aktivität derselben verursacht werden. Dann müssen die dem Brenzcatechin zukommenden physiologischen Eigenschaften mit seiner höheren chemischen Aktivität verbunden werden. Das Phloroglucin kann dagegen seiner geringeren Aktivität gemäß weder als Gift noch als Nährstoff wirken.

Nehmen wir die Pilzdeckengewichte in den Kulturen auf Dextrose mit 100 an, so drücken sich die oben angeführten Ergebnisse der Versuchsreihe 2 in den folgenden Zahlen aus:

Pilzdeckengewichte.

Konzentration in Proz.	0,5	0,1	0,05
Auf Dextrose	100,0	100,0	100,0
„ Chinasäure	84,2	93,5	104,5
„ Brenzcatechin	0	135,5	145,0
„ Hydrochinon	94,6	112,3	122,4
„ Resorcin	84,0	116,7	127,0
„ Pyrogallol	65,6	77,5	92,5

Nach Abnahme der Konzentration nimmt das Pilzdeckengewicht auf allen Phenolen im Vergleich mit dem auf Zucker zu. Was das Brenzcatechin anlangt, so wächst der Pilz auf einer 0,5proz. Lösung desselben gar nicht, bei niedrigeren Konzentrationen verläuft aber die Entwicklung auf diesem Diphenol bedeutend besser als auf anderen Phenolen und auf Zucker.

Die Ergebnisse der vorliegenden, ebenso wie der vorigen Versuche[1]) geben keine Veranlassung anzunehmen, daß die Kohlehydrate als eine Zwischenstufe bei der Verwertung der Chinasäure durch die Pilze fungieren[2]). Unter normalen Bedingungen der Kultur, sowie auch bei relativem Stickstoffmangel[3]) gelang es uns nur, die betreffenden Phenolderivate, aber niemals Zucker in den Pilzkulturen auf Chinasäure nachzuweisen. Würde sich letzterer in diesen Fällen als ein intermediäres Umwandlungsprodukt von Chinasäure bilden, so müßte sein Verbrauch durch die lebenden Zellen bei ganz unbedeutenden Konzentrationen statthaben, d. h. unter solchen Bedingungen, bei denen die sich in den Pilzkulturen auf Chinasäure stets bildenden und oft anhäufenden Phenolverbindungen ebensogut wie Zucker oder vielleicht sogar besser als dieser von den Pilzen verbraucht werden.

Wenn auch den Pflanzenzellen meist die Fähigkeit zukommt, die verschiedenen, im Überschuß zu ihrer Verfügung stehenden Kohlenstoffverbindungen in Kohlehydrate umzuwandeln und diese aufzuspeichern — eine Fähigkeit, die z. B. unter anderem bei dem Verbrauch der Fettreserven in gekeimten Ölsamen in bedeutendem Maße in Erscheinung tritt —, so ergibt sich daraus bei weitem noch nicht, daß

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, 442, 1924.
[2]) Vgl. *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**, 236, 1920; *S. Kostytschew* und *M. Afanassjewa*, Jahrb. f. wiss. Bot. **60**, 628, 1921.
[3]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **145**, l. c.

die Kohlehydrate eine obligatorische Zwischenstufe bei der Ausnutzung der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen durch lebende Protoplasten darstellen müssen. In diesen Fällen scheinen die Kohlehydrate die Rolle der zum weiteren Verbrauch leicht zugänglichen zeitweiligen Reserve zu spielen, die auch bei höheren Konzentrationen für die Zelle unschädlich sind. Weiter ist es von Wichtigkeit, daß diese Reservestoffe in einem bestimmten Grade ihrer Anhäufung durch Kondensation leicht in kompliziertere Polymere und auf diesem Wege auch in einen unlöslichen Zustand übergehen können[1]).

Von diesem Standpunkt läßt sich die Rolle der Kohlehydrate mit der des Asparagins bzw. des Harnstoffs vergleichen, soweit sich diese auch als eine zeitweilige Stickstoffreserve in den Pflanzenzellen aus verschiedenen Stickstoffverbindungen bilden, wenn dieser Stickstoff nicht sofort zum Aufbau der lebenden Zellen verwendet werden kann. Die Kohlehydrate können ebensowenig als intermediäre Umwandlungsprodukte von Kohlenstoffverbindungen angesehen werden wie die erwähnten Amide als die Produkte von Stickstoffverbindungen. Als eine wirkliche Zwischenstufe bei der Verarbeitung der Amide in den Pflanzenzellen tritt meist das Ammoniak auf, das sich intermediär auch beim Verbrauch des Asparagins und des Harnstoffs bildet[2]).

Welche Stoffe als wirkliche Zwischenprodukte bei der Verwertung von Kohlenstoffverbindungen, eingeschlossen auch die Kohlehydrate, in den lebenden Zellen auftreten, läßt sich zurzeit noch nicht mit Sicherheit beantworten[3]). Diese aktiven Elemente sind ja wahrscheinlich von einer derartigen Beschaffenheit, daß sie von den lebenden Zellen nur in geringen Konzentrationen vertragen werden und sich dort nicht in so großen Mengen wie die Kohlehydrate anhäufen können.

Was die Wege anbetrifft, welche bei der Umwandlung der Kohlehydrate während ihres Verbrauchs durch die lebenden Zellen beschritten werden, so sprechen die vorliegenden Tatsachen dafür, daß sich dieser Vorgang nicht überall in gleicher Weise vollzieht. So erweisen sich

---

[1]) Eine physiologisch wichtige Eigenartigkeit der Zuckerarten besteht auch in ihrer Fähigkeit zur Isomerisation, durch welche Modifikationen von verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften entstehen können. Vgl. *H. J. Hamburger*, Ergebn. d. Physiol. **23**, 77 (120), 1924.

[2]) *Wl. Butkewitsch*, Die regressive Metamorphose der Eiweißstoffe in höheren Pflanzen usw. 1904 (russisch) und diese Zeitschr. **16**, 411, 1909; **41**, 431, 1912; *D. Prjanischnikow*, ebendaselbst **150**, 407, 1924; *N. N. Iwanoff*, ebendaselbst **154**, 376, 391, 1924.

[3]) Vgl. *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **151**, 167 und 169, 1924.

die Alkoholgärungsorganismen, wie Hefe und gewisse, ihr nahestehende Mucorarten, als unfähig, Hexosen direkt unter Bildung von Säuren, wie Glucon-, Citronen-, Oxalsäure, zu oxydieren. Bekanntlich fehlen bei den Hefearten nicht ganz und gar oxydative Umwandlungen. Abgesehen von gärenden Hexosen, sind sie imstande, sich mit einer Menge von anderen Kohlenstoffverbindungen zu ernähren, wobei diese Verbindungen nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff mit Hilfe der oxydativen Vorgänge in den lebenden Zellen verwertet werden[1]). Der oxydative Mechanismus scheint aber bei den Hefen und den ihnen nahestehenden *Mucor*arten in anderer Weise zu funktionieren als bei den Aspergillaceen. Das geht nicht nur aus den Beziehungen zu den Hexosen hervor, sondern auch aus denen zu der Chinasäure, die von der Hefe und gewissen *Mucor*arten weder in Phenolverbindungen verwandelt, noch als eine Kohlenstoffquelle verwertet werden kann.

Der Hefe geht gleichzeitig auch die Fähigkeit ab, auf verschiedenen Benzolverbindungen zu gedeihen, die von anderen Pilzen gut verwertet werden können. *Th. Bokorny*[2]) untersuchte die Beziehungen der Hefe zu Phenol, Brenzcatechin, Hydrochinon, Resorcin, Phloroglucin, Pyrogallol, Gallussäure, Digallussäure, Salicylsäure (o-Oxybenzoesäure), p-Oxybenzoesäure, Benzoesäure und kam zu dem Ergebnis, daß alle diese Verbindungen der Hefe nicht als Kohlenstoffnahrung dienen können, sogar dann nicht, wenn sie in stark verdünnten Lösungen von 0,1 bis 0,05 Proz. angewandt werden.

Diese Ergebnisse *Bokornys* können wir auch durch eigene Beobachtungen ergänzen, nach denen sich *Mucor racemosus* ganz unfähig zeigte, auf den Nährlösungen mit Brenzcatechin zu wachsen, auf denen viele andere Pilze sehr gut gediehen.

Damit läßt sich also ein bestimmter Zusammenhang in dem Verhältnis der Pilze zu der Chinasäure und Benzolderivaten nachweisen. Wie sich aus den vorliegenden Tatsachen ergibt, scheint die Chinasäure nur für diejenigen Pilze als Kohlenstoffnahrung dienen zu können, die imstande sind, Benzolderivate zu verwerten. Dadurch bestätigt sich wiederum unsere vorige Schlußfolgerung, daß die Chinasäure gerade über die Phenolverbindungen zur Nahrung verwertet wird.

---

[1]) Vgl. *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **47**, 191 und 301, 1917; **50**, 23, 1920; *O. Fürth* und *J. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, 144; **132**, 165, 1922; *F. Lieben*, ebendaselbst **135**, 240, 1923; *H. Lundin*, ebendaselbst **141**, 310, 342; **142**, 454, 463, 1923; *K. Myrbäck* und *B. Everitt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 272, 1924.

[2]) *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **47**, l. c. — In diesem Zusammenhang ist daran zu erinnern, daß Peroxydase in Hefe, nach *A. Bach*, fehlt. *A. Bach*, Fermentforschung **1**, 197, 1916.

Mit den Besonderheiten des oxydativen Mechanismus sind wahrscheinlich auch einige andere Eigenarten bei der Verwertung der Kohlenstoffverbindungen durch die oben besprochenen Pilzarten verbunden. Diese besonderen Eigenschaften zeigen sich z. B. in bezug auf einwertige gesättigte Säuren der Fettreihe und auf Aminosäuren.

Unter den Fettsäuren vermögen, nach *E. Laurent*[1]), die Bier- und Weinhefen nur die Essigsäure zur Nahrung zu verwerten, während andere Pilze außer dieser auch auf höheren Homologen dieser Reihe wachsen können[2]). Nach den Beobachtungen von *F. Ehrlich*[3]) kann die Hefe auf den Nährsubstraten, die als einzige Kohlenstoffquelle Aminosäuren (Leucin, Glutaminsäure, Tyrosin) enthalten, weder gedeihen, noch eine Desaminierung derselben hervorbringen. Der letzte Vorgang kommt bei der Hefe unter Verwertung des abgespaltenen Stickstoffs durch die wachsenden Zellen nur in Gegenwart vergärender Zucker zur Geltung. Was die Schimmelpilze betrifft, so wachsen sie bekanntlich auch auf den Aminosäuren allein in Abwesenheit anderer Kohlenstoffquellen. Dabei vollzieht sich die Desaminierung unter Freiwerden des Stickstoffs in Gestalt von Ammoniak, das sich zum Teil im Nährsubstrat anhäuft, was bei der Hefe nie stattfindet.

Der Desaminierungsvorgang ist, wie durch unsere Versuche festgestellt wurde, oxydativer Natur und tritt bei den Schimmelpilzen nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff in Erscheinung. Die Desaminierung der Aminosäuren wird von der Oxydation der vom Stickstoff befreiten Kohlenstoffkomplexe zu Oxal- und Kohlensäure begleitet, was in den Pilzkulturen auf Aminosäuren, wie auch auf Pepton, das zunächst auch zu Aminosäuren abgebaut wird, beobachtet werden kann[4]). Der Desaminierungsprozeß verläuft bei der Hefe, wie aus den Versuchen von *Neubauer* und *Fromherz*[5]) hervorgeht, auch auf oxydativem Wege, aber dieser Oxydationsvorgang kann nach *F. Ehrlich* nur in Gegenwart von gärendem Zucker zur Geltung kommen. Also scheint es sich auch hier bei der Hefe und bei den anderen Pilzen nicht um ganz gleichartige Oxydationsvorgänge zu handeln.

---

[1]) *E. Laurent*, Ann. soc. Belge de Microscopie **14**, 29, 1890.

[2]) Vgl. *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **47**, l. c.

[3]) *F. Ehrlich*, diese Zeitschr. **36**, 477, 1911; vgl. auch *F. Lieben*, ebendaselbst **132**, 180, 1922. Es gibt jedoch Beobachtungen über das Wachtum der Hefe auf Aminosäuren, die mit denen von *Ehrlich nicht* übereinstimmen. Vgl. *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. (2) **47**, l. c.; **49**, 321, 1920 (Ref.).

[4]) *Wl. Butkewitsch*, Jahrb. f. wiss. Bot. **38**, 147, 1902; Sammelwerk *K. A. Timirjazeff* gewidmet 1916, S. 457 (russisch); diese Zeitschr. **129**, 145 und 155, 1922.

[5]) *O. Neubauer* und *Fromherz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 326, 1911.

Aus den oben erörterten Angaben unserer Versuche ergibt sich, daß die Entwicklung auf Chinasäure und auf Phenolen die Überführung der ersteren in die letzteren und die oxydative Umwandlung des Zuckers unter Bildung von Säuren, wie Glucon- und Citronensäure[1]), einen Komplex von Erscheinungen bilden, die bei den Pilzen im allgemeinen insgesamt auftreten bzw. ganz fehlen. Dies läßt sich durch die folgende Zusammenstellung veranschaulichen.

	Entwicklung auf Chinasäure und Phenolen	Umwandlung der Chinasäure in Phenolverb.	Säurebildung auf Zucker
Aspergillus niger	+	+	+
Citromyces glaber	+	+	+
Aspergillus oryzae	+	+	+
Penicillium glaucum	+	+	+
Mucor racemosus	—	—	—
Hefe	—	—	—

Ebensolche Verhältnisse wie bei den Pilzen lassen sich auch bei gewissen Bakterien nachweisen. Hier beschränken wir uns vorläufig nur auf einige der hierher gehörigen Ergebnisse, über die wir verfügen. Auf unsere Veranlassung beschäftigt sich der Mitarbeiter unseres Laboratoriums, *W. W. Perwozwansky*, gegenwärtig mit der näheren Untersuchung über die Beziehungen der die Chinasäure verwertenden Bakterien zu den Kohlehydraten und anderen Kohlenstoffverbindungen. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird in einer besonderen Mitteilung eingehender berichtet werden.

Die auf Chinasäure gedeihenden und sie in Phenolderivate überführenden Bakterien.

Zwei hierher gehörige Bakterien wurden von uns aus der Chinasäure enthaltenden und mit Soda neutralisierten Nährlösung isoliert, die im Laboratorium stehengelassen worden war. Nach Verlauf einiger Tage trübte sich die Lösung infolge der Bakterienentwicklung und erhielt eine kirschrote Farbe. Von dieser Lösung ausgehend, konnten wir leicht zwei Bakterien nach dem üblichen Verfahren auf Agarnährböden mit chinasaurem Natrium und Mineralsalzen isolieren.

---

[1]) Die von uns in der vorigen Mitteilung (diese Zeitschr. **154**, 177, 1924) ausgesprochene Vermutung, daß neben *Aspergillus niger* auch andere Pilzarten Hexosen zu Gluconsäure zu oxydieren vermögen, ist durch unsere neueren Versuche bestätigt worden. Es ist uns gelungen, diese Säure als Ca-Salz aus den Zuckerkulturen von *Citromyces glaber* und einigen anderen Vertretern der Aspergillaceen in beträchtlichen Mengen ebenso leicht wie bei *Aspergillus niger* abzuscheiden.

Die eine von diesen Bakterienarten bildete auf Agarplatten runde, flache, fast durchscheinende, schleimige Kolonien und stellte ein kleines, sehr bewegliches Stäbchen dar, das stark ausgeprägte aerotoxische Erscheinungen aufzeigte. Die andere Bakterienart bildete auf Agar stark hervorragende, kugelförmige, opalweiße Kolonien; in jüngeren Kolonien sahen die Bakterien meist wie ziemlich lange, oft gekrümmte Stäbchen mit einer sehr eigenartigen, rosenkranzförmigen inneren Struktur aus; in älteren Kulturen zerfielen die Stäbchen in kürzere Glieder und nahmen dann eine fast kokkenartige Gestalt an.

Beide Bakterienarten, von denen wir die ersten mit α und die zweiten mit β bezeichnen, wuchsen sehr gut auf Nährsubstraten, welche Chinasäure als einzige Kohlenstoffquelle enthielten. Auf solchen Nährlösungen riefen die Bakterien α eine starke Trübung hervor, und erst später bildete sich ein zartes schleimiges Häutchen auf der Oberfläche der Flüssigkeit; die Bakterien β entwickelten sich meist schon anfangs auf der Oberfläche der Flüssigkeit, die im Innern klar blieb, und bildeten eine ziemlich starke, derbe Decke. Die Bakterien gediehen auch auf den üblichen Nährböden mit Fleischextrakt und Pepton gut. Die Gelatine verflüssigten sie nicht.

In Kulturen auf Nährböden mit chinasaurem Natrium mit etwas erhöhtem Gehalt an Eisen brachten die beiden Bakterien eine für Brenzcatechin und Protocatechusäure eigentümliche kirschrote Färbung hervor. Diese kam sowohl auf flüssigen als auch auf festen Nährböden zum Vorschein; auf letzteren trat sie aber meist schwächer auf als auf ersteren.

Wandte man für die Kulturen schwächere Lösungen von Chinasäure (von 1 bis 0,5 Proz.) an, denen kleine Mengen von Ammoniak, Soda bis zur Neutralisation und notwendige Salze zugesetzt wurden, so verschwand die in den Kulturen zunächst auftretende Farbe nach Verlauf einer gewissen Zeit vollständig. Da die Flüssigkeit von solchen Kulturen alkalisch reagierte und die Färbung durch weiteres Hinzufügen von $FeCl_3$ und Na_2CO_3 nicht wieder hergestellt werden konnte, so erwies es sich, daß die aus der Chinasäure gebildeten Phenolverbindungen von den Bakterien weiter verwertet werden und nur eine Zwischenstufe bei der Umwandlung dieser Säure darstellen. Hier tritt also auch eine derartige Erscheinung auf wie bei der Verwertung der Chinasäure durch die Pilze.

Wurden die Bakterien auf der Nährlösung gezüchtet, die 3 Proz. mit Soda neutralisierte Chinasäure und 0,1 Proz. NH_4NO_3 (außerdem auch notwendige Salze) enthielt, so verhielten sich die Kulturen hinsichtlich der Färbung ihrer Flüssigkeit etwas anders als in dem soeben erörterten Falle. Die in der Kultur α zunächst auftretende, verhältnismäßig schwache kirschrote Farbe schlug nach gewisser Zeit über Violett

in Grünlichgelb um. Das Verschwinden der roten Farbe wurde aber hier nicht durch den Verbrauch der aus Chinasäure entstehenden Phenolverbindungen bedingt, sondern durch die saure Reaktion, die in dieser Kultur infolge des Verbrauchs von Ammoniak und der Anhäufung von freier Salpetersäure auftrat. Letztere ließ sich leicht mit Diphenylamin nachweisen. Nachdem die Kulturflüssigkeit durch Sodazusatz alkalisch gemacht worden war, nahm sie wieder eine intensive kirschrote Farbe an. In der Kultur β wurde die Farbe, allmählich zunehmend, endlich dunkel kirschrot, darauf nahm sie einen Stich ins Braune an und erhielt sich in diesem Zustande auch dauernd weiter. Hier reagierte die Kulturflüssigkeit stark alkalisch, da nicht nur Ammoniak, sondern auch Salpetersäure verbraucht wurde. In den vorliegenden Kulturen war die Verzögerung im Verbrauch der aus Chinasäure entstehenden Phenolverbindungen verbunden mit dem Aufhören der Bakterienentwicklung, was in der Kultur α durch die saure Reaktion und in der Kultur β durch die stark alkalische Reaktion verursacht wurde.

Was den letzteren Fall anlangt, bei dem die Verzögerung in der Entwicklung der Bakterien und gleichzeitig auch im Verbrauch der Phenolverbindungen infolge der in der Kultur auftretenden alkalischen Reaktion in Erscheinung trat, so lassen sich derartige Fälle auch bei den Pilzen beobachten, so z. B. bei *Penicillium glaucum* und *Aspergillus oryzae*, die eine stark ausgeprägte Fähigkeit besitzen, die Kohlenstoffverbindungen bis zu Kohlendioxyd zu verbrennen und die Salze der organischen Säuren in Carbonate überzuführen[1]). In den älteren Kulturen der Bakterien β auf den Nährlösungen, die 3 Proz. chinasauren Natriums enthielten, ließ sich auch ein bedeutendes Aufbrausen bei Zusatz von Säuren, d. h. die Gegenwart von Carbonaten, nachweisen. Also scheinen auch diese Bakterien zu den stark oxydierenden Organismen zu gehören und sich den soeben erwähnten Pilzen in dieser Hinsicht zu nähern.

Außer den oben besprochenen Chinasäurebakterien wurden noch zwei sporenbildende Bakterien von dem Typus *Bacillus subtilis* auf ihr Verhalten zu Chinasäure geprüft. Die eine von diesen Bakterienarten stammte aus einer Kultur, die sich zufällig auf der im *Koch*schen Sterilisator erhitzten Fleischpeptongelatine entwickelte, die andere wurde nach dem üblichen Verfahren aus Heuabsud gezüchtet. Diese beiden Bakterien zeigten sich als gänzlich unfähig, auf den Nährböden zu gedeihen, die chinasaures Natrium als einzige Kohlenstoffquelle enthielten. Mit dieser Kohlenstoffquelle ließ sich weder auf festen, noch auf flüssigen Nährböden eine Entwicklung nachweisen. Gleichzeitig waren die Bakterien nicht imstande, die Chinasäure in die Phenol-

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464, 1922; **145**, 442, 1924.

verbindungen zu verwandeln. Um die Bakterien in dieser Hinsicht zu prüfen, brachten wir die Bakteriendecken von Fleischpeptonnährlösung zur Anwendung. War der mit Soda neutralisierten und etwas $FeCl_3$ enthaltenden Chinasäurelösung eine solche Decke zugesetzt worden, so ließ sich auch bei sehr lang dauerndem Stehen dieser Lösung im Thermostaten bei 30^0 keine Färbung beobachten. Die oben erwähnten Chinasäurebakterien brachten aber die rotviolette Färbung in der Lösung unter denselben Bedingungen schon am nächsten Tage hervor.

Auf diese Weise ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem Gedeihen auf Chinasäure und der Umwandlung derselben in die entsprechenden Phenolverbindungen auch bei den Bakterien nachweisen. In dieser Hinsicht verhalten sich die Bakterien ebenso wie die Pilze.

Dieselben Verhältnisse wurden von *W. W. Perwozwansky* auch für eine Reihe von Bakterien festgestellt, die von ihm auf Chinasäurenährsubstraten aus Erdböden verschiedener Herkunft isoliert wurden. Unter anderem erwiesen sich die Chinasäure als eine Kohlenstoffquelle verwertenden Bakterien auch als fähig, auf Diphenolen, unter diesen auch auf Brenzcatechin, bei genügender Verdünnung der Lösungen gut zu gedeihen.

Von besonderem Interesse ist es aber, daß gewisse, auf Chinasäurenährböden isolierte Bakterien reichlich **Gluconsäure** in den Kulturen auf Zuckernährlösungen mit Calciumcarbonat bildeten und als Ca-Salz anhäuften.

Unter anderem machte sich eine sehr reichliche Anhäufung von Gluconsäure auf der Zuckernährlösung mit $CaCO_3$ in den Kulturen der oben beschriebenen beweglichen Bakterien α geltend. In den Kulturen der unbeweglichen Bakterien β auf derselben Nährlösung ließen sich aber weder Gluconsäure noch irgendwelche andere Säuren nachweisen, was hier vielleicht durch die rasch verlaufende Oxydation der aus Zucker entstehenden Zwischenprodukte bis zu Kohlendioxyd verursacht wurde. Daß oxydative Eigenschaften bei diesen Bakterien stark ausgeprägt sind, ergibt sich schon aus den Erscheinungen, die sich bei ihrer Entwicklung auf chinasaurem Natrium zeigten. In den Kulturen auf diesem Salze trat, wie oben erwähnt wurde, eine stark alkalische Reaktion auf und es häuften sich Carbonate an. Hier läßt sich auch eine Analogie mit den Pilzen wahrnehmen. Die Pilze, die eine stark alkalische Reaktion auf Natriumsalzen der Chinasäure sowie der anderen organischen Säuren entwickeln und Carbonate anhäufen, wie *Penicillium glaucum* und *Aspergillus oryzae*[1]), pflegen auch nicht fähig zu sein, auf Zuckernährlösungen bedeutende Mengen von

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129** und **145**, l. c.

Säuren anzuhäufen, und wenn diese sich auch hier nachweisen lassen, so nur in verhältnismäßig geringer Menge.

Die vorliegende Übereinstimmung in dem Verhalten der Organismen zu Chinasäure einerseits und zu Kohlehydraten andererseits veranlaßten uns anzunehmen, daß derselbe Oxydationsmechanismus in den beiden Fällen für die oben besprochenen oxydativen Umwandlungen maßgebend ist. Diese Vorrichtung scheinen diejenigen Organismen zu entbehren, denen die Fähigkeit, Chinasäure als eine Kohlenstoffquelle zu verwerten, fehlt.

Ob sich diese Verhältnisse wirklich in einem beständigen Zusammenhang miteinander befinden und wodurch diese Beziehungen, wenn es der Fall ist, bedingt werden, müssen weitere Untersuchungen feststellen.

Zusammenfassung.

Die Entwicklung der von uns geprüften Pilze wurde stets von einer intermediären Bildung der betreffenden Phenolverbindungen begleitet, und den Pilzen, die nicht imstande sind, diese Umwandlung zu vollziehen (Hefe, *Mucor racemosus*) ging gleichzeitig auch die Fähigkeit ab, Chinasäure als eine Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, daß der Übergang von Chinasäure zu Phenolverbindungen eine physiologisch wichtige Umwandlung darstellt, durch welche die Chinasäure den sie verwertenden Organismen zugänglich gemacht wird.

Dafür spricht auch der für die Pilze festgestellte Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, auf Chinasäure zu wachsen, und derjenigen, die Phenolverbindungen als eine Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Für die Verwertung der Polyphenole durch die Pilze ist nicht nur die Zahl der Hydroxylgruppen, sondern auch ihre Verteilung im Benzolring maßgebend.

Unter den geprüften Polyphenolen erwies sich das bei höheren Konzentrationen am giftigsten wirkende Brenzcatechin bei niedrigeren Konzentrationen als die beste Kohlenstoffquelle, und bei gleichem prozentualen Gehalt der Nährlösung an den verglichenen Kohlenstoffverbindungen entwickelte sich *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* auf Brenzcatechin bei geeigneten Konzentrationen bedeutend besser als auf Chinasäure und Zucker.

Auf genügend verdünnten Lösungen wuchs *Aspergillus niger* in äquimolaren Konzentrationen auf Brenzcatechin, Chinasäure und Zucker beinahe gleich gut.

Die Ergebnisse unserer Versuche geben uns keine Veranlassung anzunehmen, daß Kohlehydrate als eine Zwischenstufe bei dem Verbrauch der Chinasäure durch die Pilze fungieren.

Die Entwicklung auf Chinasäure und auf Phenolen, die Überführung der ersteren in die letzteren und die oxydative Umwandlung des Zuckers unter Bildung von Säuren, wie Glucon- und Citronensäure, scheinen bei den Pilzen in einem gewissen Zusammenhang miteinander zu stehen, da diese Erscheinungen gewöhnlich insgesamt auftreten bzw. fehlen.

Durch ebensolche Verhältnisse, wie sie den Pilzen eigentümlich sind, zeichnen sich auch gewisse Bakterien aus.

Bei mehreren auf Chinasäure gedeihenden und sie in Phenolverbindungen verwandelnden Bakterien wurde auch eine reichliche Bildung von *Gluconsäure* und ihre Anhäufung in Gestalt des Ca-Salzes in den Kulturen auf der Zuckernährlösung mit Calciumcarbonat nachgewiesen.

Die vorliegende Übereinstimmung in dem Verhalten der Organismen zu Chinasäure einerseits und zu Kohlehydraten andererseits legt die Vermutung nahe, daß derselbe Oxydationsmechanismus in den beiden Fällen für die oxydative Umwandlung der genannten Verbindungen maßgebend ist, und daß diese Vorrichtung denjenigen Organismen fehlt, die nicht imstande sind, die Chinasäure zu verwerten.

Bemerkungen zu der Arbeit von Leon Asher-K. Nakayama: Beiträge zur Physiologie der Drüsen. Nr. 71 usw.[1]).

Von

W. Falta.

(Eingegangen am 8. April 1925.)

Die beiden Autoren betrachten es als eine Konsequenz der „das ganze Gebiet inaugurierenden *Asher-Flack*schen Arbeit über die Innervation der Schilddrüse", daß unter anderem Adrenalin eine verschiedene Wirkung haben muß, je nachdem ein Tier im Besitz oder nicht im Besitz seiner Schilddrüse ist, oder je nachdem ein mit Schilddrüsenpräparaten vorbehandeltes oder nicht vorbehandeltes Tier vorliegt. Die Beweise für die Richtigkeit dieses Teiles der Lehre sollen gleichfalls in der *Asher-Flack*schen Arbeit erbracht worden sein. Es genügt darauf hinzuweisen, daß die Arbeit von *Asher* und *Flack* im Jahre 1911, die einschlägige Arbeit von *Eppinger, Falta* und *Rudinger*[2]) im Jahre 1908 erschienen ist.

Historisch ebenso ungenau ist die Angabe der beiden Autoren, daß nach den Untersuchungen von *Boothby* und *Sandiford* Adrenalin einen merklichen Einfluß auf den respiratorischen Stoffwechsel besitzen kann. Denn die Arbeit dieser beiden letztgenannten Autoren stammt aus dem Jahre 1922, die ersten Arbeiten von *Fuchs* und *Roth* (bei Morbus Addisonii) und von *Bernstein* und *Falta*[3]) (beim normalen Individuum), die dies einwandfrei erweisen, aus dem Jahre 1912.

[1]) Diese Zeitschr. **155**, 387, 1925.

[2]) Über die Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion. I. Zeitschr. f. klin. Med. **66**.

[3]) 29. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1912.

Über Phosphatstoffwechsel.

I. Mitteilung:

Über Hexosephosphatasen in menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten.

Von

Fritz Demuth.

(Aus der Universitätskinderklinik in Marburg.)

(Eingegangen am 11. April 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Im Jahre 1906 fand *Zaleski* (1), daß bei keimenden Pflanzen „lösliche Phosphorverbindungen unter Freisetzung von Phosphorsäure" gespalten werden. Aber erst seit den Untersuchungen von *Harden* und *Young* (2) sowie von *Neuberg* (3) kann man von der Kenntnis von Fermenten sprechen, die esterartige Phosphatverbindungen zu spalten vermögen, von Phosphatasen. Wenn man von den sich speziell mit der Physiologie des Muskels beschäftigenden Arbeiten *Embdens* (4) und seiner Schule über die Lactacidogenspaltung absieht, so ist die Zahl der Mitteilungen gering, die sich auf das Vorkommen und die Bedeutung von Phosphatasen im *menschlichen* Körper beziehen. Nur *Forrai* (5 und 6) untersuchte Glycerophosphatasen in menschlichen Organen. Über die Richtigkeit seiner Befunde wird noch zu sprechen sein, ebenso wie über die aus Tierversuchen abgeleiteten Schlüsse von *Tomita* (7), *Takahashi* (8) und besonders von *Robinson* und seinen Mitarbeitern (9, 10 und 11), von denen die Bedeutung von Phosphatasen für den Stoffwechsel und vor allem für den Knochenaufbau erkannt worden ist.

Da nun der Phosphatstoffwechsel bei Rachitis und Tetanie verändert ist, war es nicht unwahrscheinlich, daß wir Besonderheiten in der Phosphatasewirkung bei diesen Krankheitszuständen finden würden. Dies veranlaßte uns, neben einigen anderen Problemen des Phosphatstoffwechsels, über die wir fortlaufend berichten werden, auch die Frage nach der Bedeutung von Phosphatasen anzugreifen.

Da geeignete Unterlagen vorläufig fehlen, mußten die Untersuchungen auf breitester Basis vorgenommen werden, vor allem unter

Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration, die von den meisten Autoren bisher vernachlässigt worden ist. Unsere Untersuchungen beziehen sich auf denjenigen Phosphorsäureester, der im menschlichen Körper mit Wahrscheinlichkeit, und zwar in größeren Mengen vorkommt und dem daher auch eine erhöhte Bedeutung zuzusprechen ist, das Hexosediphosphat. Wir berichten hier über unsere Versuche mit Organen (mit Ausnahme von Knochen und Knorpel, die besonders abgehandelt werden) und mit Körperflüssigkeiten von Menschen, vor allem von Säuglingen.

Methode.

Wir benutzten ein 11,56 Proz. P enthaltendes Natriumhexosediphosphatpräparat, das uns von der Firma Bayer & Co. freundlichst zur Verfügung gestellt wurde. Zu je 10,0 ccm einer 1proz., stets frisch bereiteten Lösung hiervon wurden 0,5 bis 1,0 ccm Körperflüssigkeit oder etwa 0,1 g (auf 1 mg genau abgewogenen) frischen Organbreies zugesetzt. Die Organe konnten erst etwa 12 Stunden nach dem Tode der Kinder entnommen werden, so daß mit Leichenveränderungen gerechnet werden muß. Sie wurden rasch zerkleinert und im Mörser verrieben, dann bis zum Abwiegen auf einem Uhrgläschen in einem feuchten, verschlossenen Gefäß gehalten. Das Abwiegen erfolgte in den Reagenzröhrchen selbst, in denen der Versuch vor sich gehen sollte.

Zur Bestimmung der Phosphatmenge, die von den Organen abgegeben wird und die vom Endresultat nach entsprechender Umrechnung abzuziehen war, wurden auf 1 mg genau abgewogene Organbreimengen in destilliertem Wasser während der Versuchsdauer bei 40° C stehengelassen. Die an das Wasser abgegebenen P-Mengen spielen im übrigen eine ganz untergeordnete Rolle.

Da das Natriumhexosephosphat sowohl alkali- als auch besonders hitzeempfindlich ist, mußten Kontrollröhrchen zu jedem Versuchsröhrchen angesetzt werden. Die sich durch diesen Spontanzerfall ergebenden Mengen anorganischen Phosphats waren ebenfalls vom Endresultat abzuziehen. Sie spielen besonders in stärker alkalischem Bereich eine recht erhebliche Rolle.

Bei den Versuchen mit Körperflüssigkeiten wurde deren P-Gehalt mit dem Spontanzerfall des Hexosephosphats zusammen bestimmt, indem zu den Kontrollröhrchen unmittelbar vor Abbrechen des Versuchs die entsprechende Menge der Flüssigkeit zugesetzt wurde. Auf diese Weise mußten auch eventuell entstehende Fehler durch Adsorption bei der Enteiweißung in den Kontrollen gleich groß werden, wie in den Versuchsröhrchen.

Die Variation der Wasserstoffionenkonzentration erfolgte durch Zusatz von n/10 NaOH und n/10 HCl. Die Pufferung durch das Hexosephosphat war vollkommen ausreichend, um eine konstante *h* zu gewährleisten. Der größte Unterschied in der mit den Indikatoren von *Michaelis* und *Gyemant* (12) gemessenen Acidität nach Beendigung des Versuchs gegenüber dem Beginn betrug $+ p_H$ 0,35 und $- p_H$ 0,4. Bei 50 Versuchen aber war die Differenz nur fünfmal größer als p_H 0,1, d. h. außerhalb der Fehlergrenze der Methode.

Alle Röhrchen einer Versuchsreihe wurden auf gleiches Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt, in der Regel auf 15 ccm.

Die Enteiweißung geschah mit 20proz. Trichloressigsäure (es wurden meist 0,5 bis 1,0 ccm auf 3,0 ccm Versuchsflüssigkeit gegeben, mit Wasser auf 6,0 aufgefüllt und vom Filtrat 2,0 ccm oder dem Versuch entsprechend passende aliquote Teile verwendet).

Als Maß der fermentativen Spaltung diente die Menge des entstandenen anorganischen Phosphats. Es wurde mit der Methode von *Briggs* (13) bestimmt. Diese gibt mit dem Hexosephosphat nur eine unbedeutende Trübung als Zeichen einer geringen Verunreinigung des Präparats (in 1 ccm der 1proz. Lösung 0,0256 mg P).

Die Methode hat den Vorzug, daß größere Reihenversuche angesetzt werden können und daß nicht erwärmt werden muß; denn bei einer Erhitzung auf nur 60 bis 70° C zerfällt schon das Hexosephosphat zum Teil. Die Genauigkeit der Methode übersteigt bei weitem das in unseren Versuchen verlangte Maß.

Die Versuchsdauer betrug in der Regel 48 Stunden, die Temperatur des Wasserbades 40° C (± 1°). Ein Bakterienwachstum wurde durch Zusatz einiger Kristalle von Thymol verhindert, von dem nach *Euler* und *Johansson* (14) keine Hemmung, sondern eher eine Förderung der Spaltung zu erwarten war.

Die Ergebnisse haben wir in den folgenden Kurven so dargestellt, daß auf der Abszisse die Wasserstoffexponenten, auf der Ordinate die Mengen von anorganischem Phosphat als Milligramme P abgetragen sind, die von 1 ccm Flüssigkeit oder 0,1 g Organsubstanz aus 10 ccm 1proz. Natriumhexosediphosphatlösung in 48 Stunden bei 40° C abgespalten worden sind. Daß diese Umrechnung auf eine bestimmte Menge berechtigt ist, ergibt sich aus der Abb. 1, in der gezeigt wird, daß die Menge des abgespaltenen Phosphats in dem von uns verwendeten Bereich den Fermentmengen proportional ist. (Die Maßstäbe der Kurven sind verschieden!)

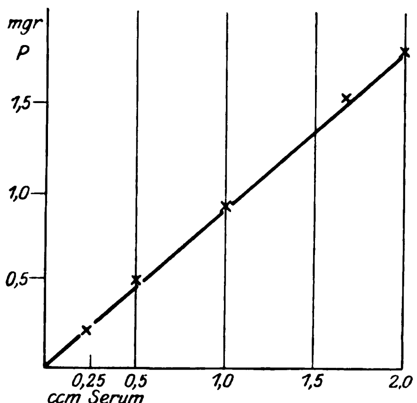


Abb. 1. Serumphosphatase in verschiedener Menge: Die Umsätze sind den Fermentmengen proportional.

Ergebnisse.

Organe.

In allen von uns untersuchten Organen (Niere, Nerv, Milz, Muskel, Pankreas, Leber) wurde eine Hexosediphosphatase gefunden. Sowohl *Tomita* (7) (Saccharophosphatase), wie *Forrai* (6) und *Takahashi* (8) (Hexosediphosphatase) stellen eine Reihenfolge auf nach der Stärke der Spaltungskraft der verschiedenen Organe. Dabei ergibt sich übereinstimmend, daß der Muskel am wenigsten spaltet, was *Oppenheimer* (15) zu der Bemerkung veranlaßt, daß dieser Befund *Tomitas* bei Saccharophosphatase „für eine Verschiedenheit vom Lactacidogen spaltenden

Ferment spricht". Die genannten Autoren haben aber nicht die *h* berücksichtigt. Nur *Tomita* verwandte einen n/1-Acetatpuffer im Verhältnis 1 : 2, er dürfte also in einem Aciditätsbereich von etwa $p_H = 5$ gearbeitet haben. Aus unserer Abb. 2 ergibt sich nun, warum er und wahrscheinlich auch *Forrai* und *Takahashi* beim Muskel die geringste Spaltung gefunden haben: Das *h*-Optimum des Muskels liegt im alkalischen Bereich, etwa bei $p_H = 7{,}4$, das des Nervengewebes unfern dem Neutralpunkt. Betrachtet man die Stärke der Spaltung etwa zwischen p_H 5 und 6, so findet man genau die gleiche Reihenfolge, wie bei *Tomita* (Niere, Milz, Pankreas, Gehirn, Muskel) oder bei *Forrai* und *Takahashi* (Niere, Milz, Muskel). Es ist ganz unstatthaft, eine

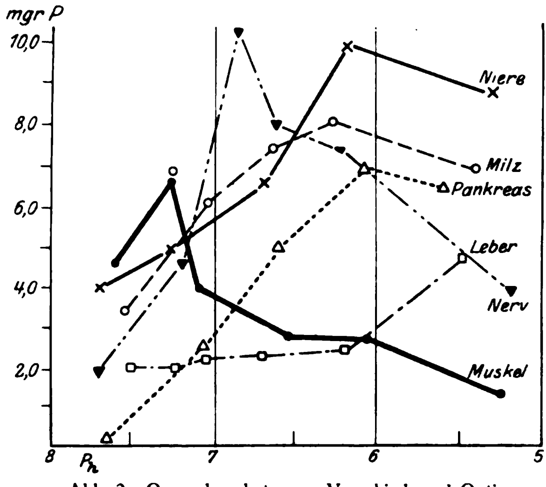


Abb. 2. Organphosphatasen. Verschiedene *h*-Optima.

solche Reihe aufzustellen. Unsere Versuche geben uns nur an, welche Mengen anorganischen Phosphats die verschiedenen Organe unter den einmal gegebenen Bedingungen abgespalten haben, von denen die augenblicklichen (zum Teil zufälligen, zum Teil — wie die Wasserstoffionen — geregelten) Ionenkonstellationen die wichtigsten sein dürften, zu denen sicher aber auch der Kolloidzustand, die Menge der durch Autolyse gebildeten Produkte usw. gehören.

Wenn man den Wasserstoffionen unter den übrigen eine besondere Bedeutung beimessen darf und wenn man annimmt, daß die Verhältnisse der übrigen Ionen in unserem Modellversuch nicht zu sehr von denen im lebenden Organismus abweichen, so ergibt sich, daß die Phosphatase des Muskels im Körper nicht die ungünstigsten, sondern die günstigsten Bedingungen vorfindet, ein Befund, der bei der Bedeutung der Hexosephosphatasen für die Muskelaktion auch sehr wahrscheinlich war.

Körperflüssigkeiten.

Von den Sekreten haben wir Magensaft, Galle, Speichel und Milch untersucht. Im Säuglingsmagensaft konnten wir im Bereich von p_H 8,5 bis 1,8 niemals eine Phosphatase nachweisen. Mit Leichengalle (Abb. 3) fanden wir eine sehr starke Spaltung mit einem h-Optimum

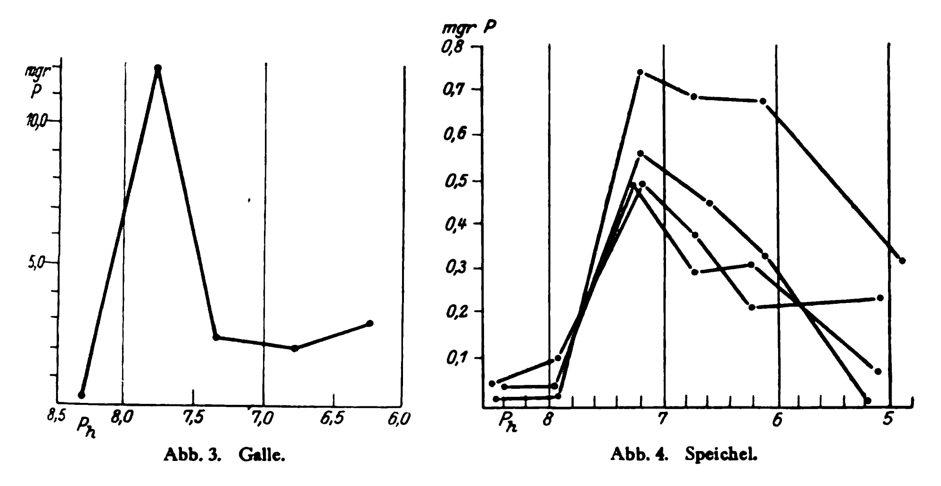


Abb. 3. Galle. Abb. 4. Speichel.

bei p_H 7,8. Speichel von Erwachsenen (Abb. 4) spaltet sehr viel weniger. Das Optimum liegt in unseren Versuchen ziemlich scharf bei p_H 7,2.

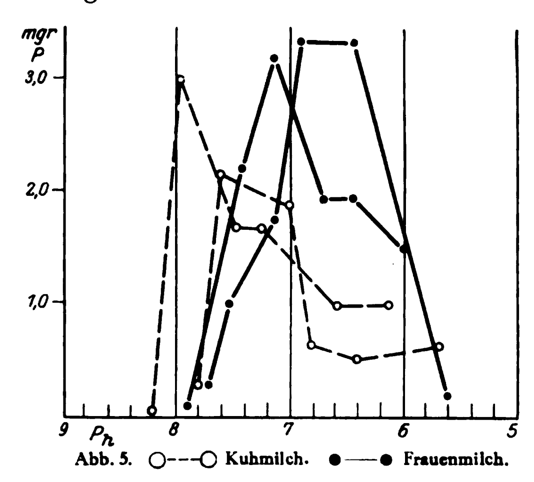


Abb. 5. ○---○ Kuhmilch. ●——● Frauenmilch.

Sowohl in Frauenmilch, wie Kuhmilch (Abb. 5) fanden wir eine recht lebhafte Spaltung. Das Optimum der Frauenmilch liegt etwa beim Neutralpunkt, das der Kuhmilch mehr nach der alkalischen Seite.

Urin (Abb. 6, von Säuglingen) gibt eine mäßige Spaltung mit Optimum etwa bei p_H 5. Dabei unterscheidet sich der Urin von Säuglingen nicht von dem von Erwachsenen und auch der von Rachitikern nicht von dem von gesunden Kindern. Es soll hier nicht darauf eingegangen werden, welche Bedeutung dem Optimum in so auffallend

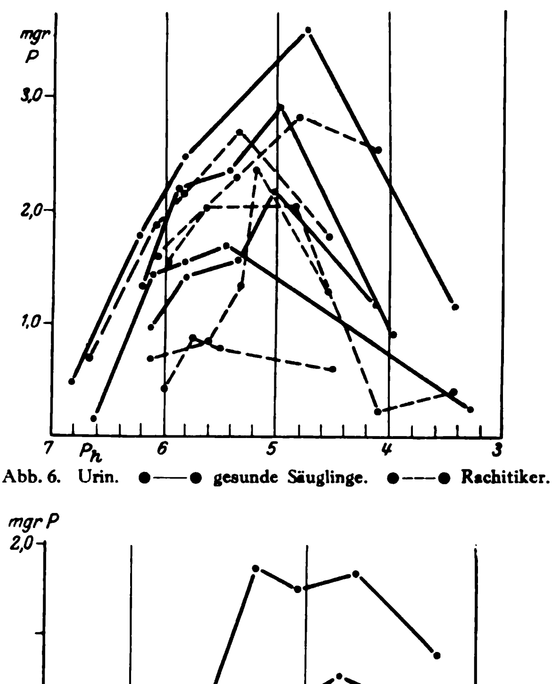


Abb. 6. Urin. ●——● gesunde Säuglinge. ●---● Rachitiker.

Abb. 7. Liquor cerebrospinalis. × gesunde Säuglinge. ●---● Rachitiker. ●——● Meningitis.

saurem Milieu zukommt. Wir bemerken nur, daß keine Beziehungen bestehen zwischen Optimum oder Menge des abgespaltenen Phosphats und Menge des anorganischen Urinphosphats.

Dem Liquor cerebrospinalis (Abb. 7) des gesunden Säuglings kommt nur eine sehr geringe spaltende Kraft zu, die etwa $^1/_6$ von derjenigen

beträgt, die wir im Blutserum fanden. Den höchsten Punkt in unseren Untersuchungen erreicht noch der Liquor von einem Rachitiker. Eine auffallende Ausnahme aber macht der Liquor von zwei Kindern mit Meningitis. Hier erreichen die Werte fast das 10fache des Normalen.

Zur Untersuchung des Blutes wurde dieses vom nüchternen Menschen entnommen. Vom Serum war nach *Forrai* nur eine geringe Spaltung zu erwarten. Tatsächlich fanden wir bei gesunden Erwachsenen (Abb. 8) nur eine geringe Fermentwirkung. Es besteht eine breite optimale Zone zwischen p_H 6,8 und p_H 7,8. Serum von Säuglingen spaltet etwa doppelt so stark wie das von Erwachsenen (siehe Mittelkurve in Abb. 8 und Punkte in Abb. 9). Auch hier besteht eine gleiche optimale Zone etwa zwischen 6,8 und 7,8.

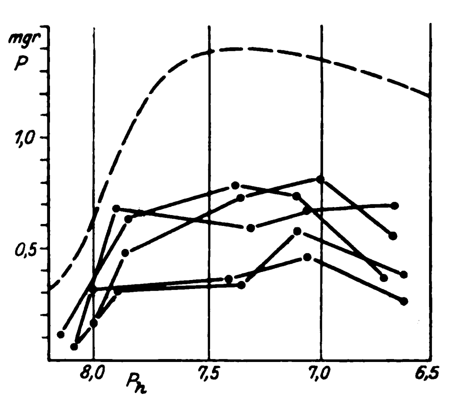


Abb. 8. Blutserum: ●——● Erwachsene. – – – Durchschnittskurve von Säuglingen (in vergrößertem Maßstabe gegenüber Abb. 9).

Bei florider Rachitis wurde nun aber eine Eigentümlichkeit gefunden. Während sich unter p_H 7,4 und über p_H 8,1 die Befunde mit

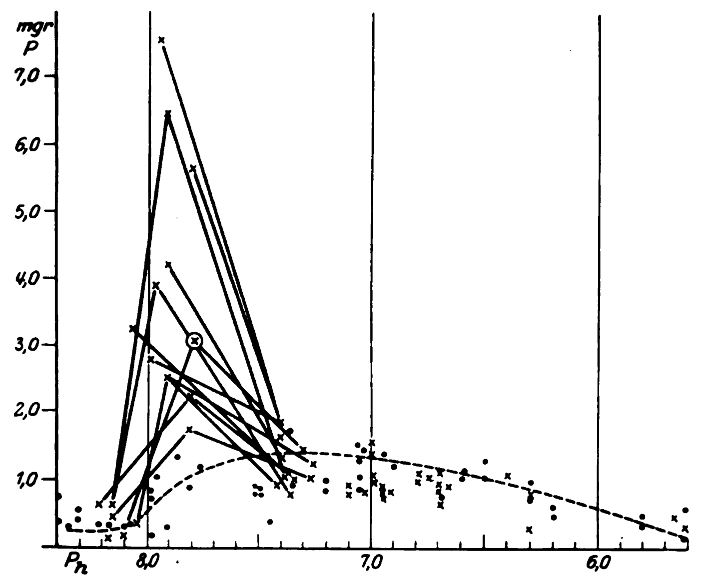


Abb. 9. Blutserum: ● gesunde Säuglinge (– – – – Durchschnittskurve). × Rachitiker (×——× ausgezogene Kurve von Rachitikern zwischen p_H 7,3 und 8,2). ⊗ manifeste Tetanie.

denen von gesunden Kindern decken, besteht an einem ganz scharf umschriebenen Punkte, nämlich bei p_H 7,9 eine außerordentlich starke Erhöhung der Spaltung bis zum 7fachen des Normalen. Nach beiden Seiten, besonders aber nach der alkalischen, fallen die Kurven rasch ab (Abb. 9, Kreuze). Unseres Wissens ist der Befund einer Verschiebung des *h*-Optimums mit gleichzeitiger Einengung und stark erhöhter Wirkung eines Ferments bei einer Erkrankung in der Lehre von den Fermenten bisher einzig dastehend. Wir sind auch nicht in der Lage, eine Erklärung zu geben. Es lag nahe, sie in dem niedrigen Serum-P-Spiegel des Rachitikers zu suchen. Nach dem Massenwirkungsgesetz muß Phosphat die Phosphatase hemmen. Die Spaltung ließ sich auch sowohl beim Erwachsenen, wie beim Säugling und beim Rachitiker (Abb. 10) durch Phosphatzusatz etwas herabsetzen, aber doch nie so sehr, daß etwa der hohe Wert beim Rachitiker auf einen Normalwert gedrückt wurde. Im angeführten Falle wurde der Serum-P-Spiegel von 2,75 mg-Proz. durch Phosphatzusatz auf 6,50 mg-Proz. P erhöht, die Spaltung aber kaum erniedrigt. Weiter fehlt beim Erwachsenen, dessen P-Spiegel ebenfalls niedrig ist, das Optimum und die Spaltung ist nur halb so groß wie beim Säugling. Das könnte allerdings an einer geringeren Fermentmenge liegen. Das Serum eines Kindes mit manifester Tetanie, bei dem der P-Gehalt des Serums 6,0 mg-Proz. betrug, verhielt sich wie das von Rachitikern. Die Kurve ist unter den Rachitikerkurven mit eingezeichnet und der Optimalpunkt mit 3,11 mg-Proz. durch einen Kreis markiert. Der P-Gehalt des Serums beim Rachitiker kann also nicht zur Erklärung herangezogen werden.

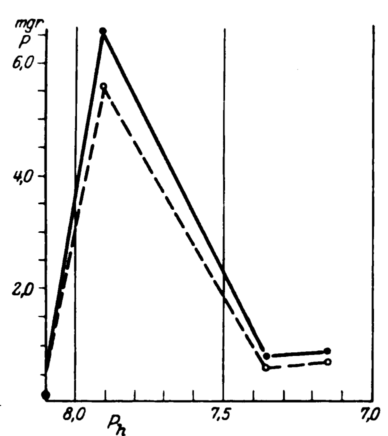


Abb. 10. Erniedrigung durch Phosphatzusatz. ●——● Serum von Rachitiker. ○---○ dasselbe mit Phosphatzusatz.

Aber auch die übrigen Ionen kommen kaum in Betracht, da sie bei Rachitis nicht regelmäßig gegen die Norm verändert sind. Wir werden über die Einwirkung der einzelnen Ionen im übrigen besonders berichten.

Auch Stoffwechselschlacken, die bei Rachitis und Tetanie in größerer Menge auftreten, kamen in Frage. Aber Aceton und β-Oxybuttersäure hemmen die Phosphatase, was auch *Harpuder* und *Erbsen* (16) für das Lactacidogenferment fanden, Acetessigsäure fördert zwar etwas, aber nicht in einem solchen Ausmaße, daß wir eine Verdoppelung oder gar eine Versiebenfachung erklärt hätten. Weitere noch im Gange be-

findliche Untersuchungen haben bisher ebenfalls zu keinem Ergebnis geführt.

Es sei noch bemerkt, daß der beschriebene Befund nur besteht, solange die Rachitis floride ist. Z. B. fanden wir bei einem Rachitiker mit einem P-Spiegel von 3,35 mg-Proz. einen Höchstwert von 5,64 mg P, nach 46 Tagen bei einem P-Spiegel von 5,2 mg-Proz. aber nur 1,39 mg P.

Auf die Deutung unserer Befunde soll hier noch nicht eingegangen werden. Wir wollen nur die Möglichkeit einer Erklärung des hohen P-Spiegels bei Tetanie besprechen. Da sich hier die Serumphosphatase wie bei Rachitis verhält, die Blutreaktion aber nach der alkalischen Seite verschoben ist, ist es durchaus möglich, daß die Serumphosphatase aus den Phosphatestern des Blutes infolge der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes nach dem Optimalbereich der Rachitikerserumphosphatase hin mehr anorganischen P abspaltet als dies bei der mehr nach der sauren Seite liegenden Reaktion des Rachitikerblutes möglich ist. Daß diese Möglichkeit tatsächlich besteht, soll in einer späteren Mitteilung gezeigt werden.

Zusammenfassung.

1. Hexosediphosphatasen wurden beim Menschen gefunden in: Leber, Milz, Muskel, Nerv, Niere, Pankreas und Speichel, Galle, Frauenmilch, Urin, Liquor cerebrospinalis, Blutserum, außerdem in Kuhmilch.

2. Die *h*-Optima der Organ- und der Körperflüssigkeitsphosphatasen wurden festgelegt.

3. Besonderheiten wurden gefunden: im Liquor cerebrospinalis bei Meningitis, im Serum bei Rachitis und Tetanie.

Literatur.

1) *Zaleski*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **24**, 285, 1906. — 2) *Harden* und *Young*, Proc. of Royal Soc. Ser. B. **82**, 321, 1910. — 3) *Neuberg*, diese Zeitschr. **23**, 1910 u. ff. Bde. — 4) *Embden* und Mitarbeiter, Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 1915 u. ff. Bde. — 5) *Forrai*, diese Zeitschr. **142**, 282, 1923. — 6) *Derselbe*, ebendaselbst **145**, 54, 1924. — 7) *Tomita*, ebendaselbst **131**, 170, 1922. — 8) *Takahashi*, ebendaselbst **146**, 161, 1924. — 9) *Robison*, Biochem. Journ. **17**, 286, 1923. — 10) *Robison* und *Soames*, ebendaselbst **18**, 740, 1924. — 11) *Kay* und *Robison*, ebendaselbst **18**, 755, 1924. — 12) *Michaelis* und *Gyemant*, diese Zeitschr. **109**, 165, 1920. — 13) *Briggs*, Journ. of biol. Chem. **53**, 14, 1922. — 14) *Euler* und *Johansson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 175, 1912. — 15) *Oppenheimer*, Die Fermente. Leipzig, Thieme, 1924. — 16) *Harpuder* und *Erbsen*, Klin. Wochenschr. **4**, 6, 283, 1925.

Über die Wirkung des Wismuts auf die roten Blutkörperchen.

Von

Alexander Simon.

(Aus dem pharmakologischen Institut der „Pázmány-Péter"-Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 13. April 1925.)

In neuerer Zeit gab die erfolgreiche Behandlung der Syphilis mit Wismut den Forschern viele Veranlassung, die Wirkung dieses früher nur seiner bedeckenden, adstringenten Wirkung wegen angewandten Mittels auf den Körper näher zu ergründen, Und wahrlich, während der letzten Jahre sind mehrere Arbeiten erschienen, die sich mit der Ablagerung des Wismuts im Körper und mit der Ausscheidung desselben befassen (1).

Unser Ziel war die Klarmachung der Wirkung des Wismuts auf die roten Blutkörperchen. Daß das Wismut auf die roten Blutkörperchen wirkt, ist schon lange festgestellt. *Kobert* (2) schreibt darüber folgendes: „Im Blute lagert sich das Wismut . . . außer in weiße Blutkörperchen auch in rote ein und bedingt massenhaften Untergang derselben, der sich durch reichliche Hämoriderinablagerung in Milz, Leber, Darmschleimhaut usw. verrät."

Da aber diese Tatsache nicht bekannt ist, und auch pharmakologische Lehrbücher nichts davon sagen, halten wir es für nicht überflüssig, zwei auch in dieser Richtung vorgenommene Tierversuche bekanntzugeben. Bei den Versuchen diente als Wismutpräparat das von der ungarischen chemischen Fabrik „Richter" hergestellte Bismoluol, welches Dikaliumwismuttartrat ist. Wismutgehalt 12,3 Proz. Die Lösung ging durch einige Tropfen Na_2CO_3 besser vonstatten. Die Injektionen geschahen subkutan und nach der Blutkörperchenzählung.

1. Hund. 25. April 1924. Gewicht 6,2 kg. Erythrocytenzahl (E. Z.) 7270000. Hgb. 96,5 Proz. Erste Injektion 0,14 g Bismoluol. 28. April: E. Z. 7210000, Hgb. 96,5 Proz. Zweite Injektion 0,14 g Bismoluol. 30. April: E. Z. 6670000, Hgb. 89,5 Proz. 1. Mai: E. Z. 6490000, Hgb. 96,5 Proz.

Dritte Injektion 0,14 g Bismoluol. 2. Mai: E. Z. 6760000. Vierte Injektion 0,28 g Bismoluol. 3. Mai: E. Z. 6910000, Gewicht 5,3 kg. 8. Mai: Fünfte Injektion 0,28 g Bismoluol. 9. Mai: E. Z. 6900000, Hgb. 96,5 Proz. 10. Mai: E. Z. 7280000, Gewicht 4,85 kg. Versuch wird beendigt, der Hund erholt sich langsam aus der schweren Vergiftung.

2. Hund. 26. November: Gewicht 7,45 kg, E. Z. 7310000. Erste Injektion 0,35 g Bismoluol. 28. November: E. Z. 7320000. Zweite Injektion 0,35 g Bismoluol. 1. Dezember: E. Z. 6380000. 2. Dezember: E. Z. 6800000. Gewicht 6,95 kg. Dritte Injektion 0,20 g Bismoluol. 3. Dezember: E. Z. 6620000. Vierte Injektion 0,35 g Bismoluol. 4. Dezember: E. Z. 6500000. 9. Dezember: Fünfte Injektion 0,50 g Bismoluol. 10. Dezember: Sechste Injektion 0,50 g Bismoluol. 11. Dezember: E. Z. 6560000. Versuch wurde beendigt.

4 bis 5 Stunden vor jeder Blutkörperchenzählung wurde den Tieren Nahrung und Wasser entzogen, um der Blutkörperchenzählung hindernden Störungen vorzubeugen [*Buntzen* (3)]. Die Zählungen geschahen immer in derselben Zeit. Während der Zeit der Injektionen hatten die Tiere immer wohlgeformten Stuhlgang; der Harn war immer strohgelb. Mikroskopische Hämaturie zeigte sich, damit kann aber die bedeutende Herabsetzung der Zahl der Blutkörperchen nicht erklärt werden. Wir halten es aber für charakteristisch, daß die Blutkörperchenverminderung unter eine gewisse Grenze nicht herabgedrückt werden konnte; im Gegenteil kehrte die Zahl beim ersten Hunde trotz der angewandten großen Dosen zur Norm zurück.

Nachher beschäftigten wir uns mit der Wirkung des Wismuts auf die roten Blutkörperchen „in vitro". Den Impuls zu diesen Untersuchungen gaben die Experimente von *Gunn* (4) und später von *Gunn* und *Feltham* (5), denen zu beweisen gelungen war, daß das Arsen in gewissen Konzentrationen die Blutkörperchenresistenz gegen hämolytische Agenzien (destilliertes Wasser, Saponin, Na-Glykocholat) „in vitro" erhöht.

In den ersten Versuchen überzeugten wir uns von der hämolytischen Wirkung des Wismuts in vitro. Zu diesen und den weiteren nachfolgenden Untersuchungen bekamen wir das Blut von den ambulanten, in guter Konstitution stehenden Kranken beiderlei Geschlechts der Haut- und Geschlechtsklinik der Universität. Aus dem mit Glasperlen defibrinierten Blute von fünf Kranken machten wir fünf Suspensionen von der Verdünnung 1 : 15 (1 Teil Blut, 15 Teile 0,9 proz. NaCl-Lösung); 0,5 ccm dieser Suspensionen wurde dann in fünf gleich große, kleine Röhrchen abgemessen und nachher zu sechs Röhrchen 1 ccm Bismoluollösung von der Verdünnung 1 : 500 (1 Teil Bismoluol + 500 Teile 0,9 proz. NaCl-Lösung) gegeben. Nach einer Stunde hämolysierten bei Zimmertemperatur alle Röhrchen.

In den folgenden Versuchen untersuchten wir die Wirkung kleinerer Bismoluolkonzentrationen. Es wurde eine Bismoluollösungsreihe

von stets wachsender Verdünnung (die kleinste Verdünnung war 1 Teil Bismoluol + 500 Teile 0,9 proz. NaCl-Lösung) bereitet. Für die Kontrollröhrchen wurde eine entsprechende Lösungsserie aus KNa-Tartrat mit Hilfe von 0,9 proz. NaCl-Lösung hergestellt. Die Ausführung der Versuche geschah folgendermaßen: Aus der Blutsuspension von der Verdünnung 1 : 15 wurden in einer aus gleich großen kleinen Röhrchen bestehenden Reihe 0,5 bis 0,5 ccm abgemessen und nachher jedes Röhrchen mit 0,5 ccm Bismoluollösung beschickt, so daß die Bi-Konzentration in den nacheinanderstehenden Röhrchen immer kleiner wurde. Zu den Kontrollröhrchen, worin sich auch 0,5 ccm Blutsuspension befand, wurde statt Bismoluollösung 0,5 ccm KNa-Tartratlösung von der entsprechenden Menge gegeben. Nachher wurden die Röhrchen 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur belassen. Um die Senkung der Blutkörperchen zu verhindern, wurden die Röhrchen von Zeit zu Zeit gelinde geschüttelt. Nach 1 Stunde war Hämolyse nirgends zu sehen. Jetzt wurde jedes Röhrchen mit 1 ccm destilliertem Wasser beschickt. Darauf hämolysierten die Röhrchen mit größerer Bismoluolkonzentration gänzlich oder teilweise, mit der Abnahme der Konzentration verminderte sich der Grad der Hämolyse. In den anderen Röhrchen, die Kontrollen inbegriffen, wurde keine Hämolyse beobachtet. Nach Abmessen von noch 0,5 ccm destilliertem Wasser in jedes Röhrchen hämolysierten die Kontrollröhrchen gänzlich oder teilweise, außerdem wurde eine ausgesprochene Hämolyse bei den Bismoluolröhrchen mit den kleinsten Konzentrationen beobachtet. Aber es zeigte sich in den mittleren Röhrchen entweder gar keine oder eine Hämolyse von bedeutend geringerem Maße als bei den anderen Röhrchen. Diese Röhrchen waren weniger durchsichtig, das hinter dem Röhrchen stehende bedruckte Papier war nicht oder in geringerem Maße zu lesen als bei den Kontrollröhrchen mit den kleinsten Bismoluolkonzentrationen. Nach Ablauf von 10 bis 15 Stunden waren diese farblos, oder nicht so intensiv rot als die anderen und es sammelten sich am Grunde dieser Röhrchen mehr Blutkörperchen.

Die größten bzw. die kleinsten Bismoluolkonzentrationen, bei welchen die resistenzerhöhende Wirkung ihren Anfang nahm bzw. endete, waren individuell verschieden. Die größte Konzentration war 1 : 1500, die kleinste 1 : 20000 (hier und im weiteren ist schon in die Bismoluolkonzentration die durch die 0,5 ccm Blutsuspension hervorgerufene Verdünnung eingerechnet). Wir sahen einen Fall, bei dem die Resistenzerhöhung zwischen 5000 bis 20000 Verdünnung zu beobachten war. Dagegen gab es drei Fälle, wo die Grenzkonzentrationen viel näher fielen: 2500 bis 5000. Die Grenzkonzentrationen waren also auch verschieden (Tabelle I).

Solcherweise haben wir elf Blutproben untersucht. In einem Falle haben wir aber keine Resistenzerhöhung erhalten. Im zweiten Falle arbeiteten wir statt mit Blutsuspensionen mit in 0,9 proz. NaCl dreimal gewaschenen Blutkörperchen, wo wir nach der letzten Zentrifugation eine 1 : 15 Verdünnung herstellten. In diesem Falle fanden wir dasselbe wie bei den anderen Bluten, nur zeigten sich die beschriebenen Erscheinungen schon bei Zusatz von nur 1 ccm destilliertem Wasser (Tabelle I).

Tabelle I.

Resistenzerhöhung durch Bismoluol.

Nr.	Bismoluolkonzentration	Hämolyse durch dest. Wasser	Blut
1	1 : 5000 bis 1 : 15000	1,5 ccm	Defibriniert
2	1 : 5000 „ 1 : 10000	1,0 „	Gewaschene Blutkörperchen
3	1 : 1500 „ 1 : 5000	1,5 „	Defibriniert
4	1 : 3300 „ 1 : 6600	1,5 „	„
5	1 : 3300 „ 1 : 5000	1,5 „	„
6	1 : 2500 „ 1 : 5000	1,5 „	„
7	1 : 5000 „ 1 : 20000	1,5 „	„
8	1 : 2500 „ 1 : 5000	1,5 „	„
9	1 : 2500 „ 1 : 5000	1,5 „	„
10	1 : 2500 „ nicht festgest.	1,5 „	„
11	Keine Resistenzerhöhung	1,5 „	„

Das Bismoluol ruft also in größeren Konzentrationen Hämolyse hervor; die Konzentration vermindernd, kann man schon keine Hämolyse beobachten, aber es zeigt sich Resistenzverminderung, dann in noch kleineren Mengen Resistenzerhöhung und am Ende ist das Bismoluol auf die Blutkörperchen wirkungslos.

Um uns aber noch mehr zu versichern, daß hier von Bi-Wirkung die Rede ist, haben wir Ammoniumwismutcitrat hergestellt und so ein in Wasser wohllösliches Präparat von 6,0 Proz. Bi-Gehalt gewonnen. Nachher stellten wir ebenso wie früher Bismoluol mit Hilfe von 0,9 proz. NaCl-Lösung auch aus Ammoniumwismutcitrat eine Verdünnungsreihe her (Grundlösung 1 : 2500) und führten die Versuche so wie früher aus. In dieser Versuchsreihe zeigte sich in drei von sieben Fällen Resistenzerhöhung in den mittleren Röhrchen bei Zugabe von 1,5 ccm destilliertem Wasser. In den Kontroll- und den anderen wismuthaltigen Röhrchen kam Hämolyse zustande. In vier Fällen war aber diese Wassermenge schon zu viel: es hämolysierten alle Röhrchen. Darum verfuhren wir vorsichtiger; wir gaben außer dem 1 ccm nur 0,2 ccm bzw. in einem Falle 0,4 ccm destilliertes Wasser zu den Röhrchen und so erhielten wir auch in diesen Fällen die früher beschriebenen charakteristischen Erscheinungen. Der Beginn der Resistenzerhöhung war hier, im Gegensatz zum Bismoluol, in größeren Verdünnungen zu

finden. Die kleinste Verdünnung war 1 : 10000 (die durch die 0,5 ccm Blutsuspension hervorgerufene Verdünnung mitgerechnet), die größte 1 : 20000. In drei Fällen waren die zwei Grenzkonzentrationen, zwischen welchen Resistenzerhöhung zu beobachten war, sehr nahe zueinander. Bei einer gewissen Konzentration erhielten wir Resistenzerhöhung, bei einer mit 1000 größeren und kleineren Verdünnung aber schon nicht (Tabelle II).

Tabelle II.

Resistenzerhöhung durch Ammoniumwismutcitrat.

Nr.	Ammoniumwismutcitrat ccm	Hämolyse durch dest. Wasser	Blut
1	1 : 12 000	1,5 ccm	Defibriniert
2	1 : 14 000	1,5 „	„
3	1 : 12 000 bis 1 : 14 000	1,2 „	„
4	1 : 20 000	1,5 „	„
5	1 : 10 000 bis 1 : 20 000	1,2 „	„
6	1 : 14 000 „ 1 : 16 000	1,2 „	„
7	1 : 12 000 „ 1 : 18 000	1,4 „	„
8	Keine Resistenzerhöhung	1,5 „	„
9	„ „	1,5 „	„
10	„ „	1,5 „	„

Wir untersuchten außerdem solcherweise noch drei Blute, im ganzen also zehn, aber hier konnten wir nur Resistenzverminderung beobachten. Da aus den Untersuchungen von *Gunn* und *Feltham* nicht ersichtlich ist, ob sie mit verschiedenem Blute gearbeitet haben oder nicht, können wir darüber keinen Aufschluß geben, ob negative Resultate auch mit Arsen gewonnen sind oder nicht.

Da nach den Befunden von *Gunn* die Resistenzerhöhung durch Arsen schon in einer Viertelstunde zu beobachten war, untersuchten wir auch, wie die Resistenzerhöhung durch Wismut von der Zeit abhängig ist. Zu diesen Versuchen wurde nur solches Blut angewendet, bei welchem Resistenzerhöhung in 1 Stunde festzustellen war. Sonst wurden die Versuche wie oben ausgeführt. Unter vier Fällen trat Resistenzerhöhung in einer halben Stunde nur in einem Falle auf, bei den anderen nicht. Nach einer dreiviertelstündigen Inkubation erhöhte sich die Resistenz in drei Fällen unter sechs.

Aus diesen Versuchen kann man also darauf schließen, daß das Bi im Gegenteil zum Arsen Resistenzerhöhung nach Ablauf von längerer Zeit, ungefähr 1 Stunde, hervorruft.

In den letzten Untersuchungen hämolysierten wir statt mit destilliertem Wasser mit Saponin (Digitonin), um die Überzeugung zu gewinnen, ob das Wismut die roten Blutkörperchen auch gegen

ein Einwirken, das bei einem anderen Mechanismus Hämolyse hervorruft, schützen kann (Tabelle III). Die Versuchsanstellung war die früher beschriebene. In jedem Röhrchen war 0,5 ccm Blutsuspension + 0,5 ccm Bismoluollösung bzw. in drei Fällen 0,5 ccm Ammoniumwismutcitratlösung (die Grundlösungen waren gleich den früher beschriebenen). In die Kontrollröhrchen setzten wir KNa-Tartrat bzw. 0,9 proz. NaCl-Lösung zu. Außerdem arbeiteten wir in zwei Fällen mit gewaschenen Blutkörperchen. Nach Ablauf von 1 Stunde gaben wir zu jedem Röhrchen zuerst 1 ccm Digitoninlösung (*Merck*) von der Verdünnung 1 : 100000 (1 Teil Digitonin + 100000 Teile 0,9 proz. NaCl-Lösung). Keine Änderung. Dann beschickten wir jedes Röhrchen noch mit 0,5 ccm Digitoninlösung, worauf in einem Falle nach einigen Minuten die charakteristischen Erscheinungen sich zeigten; in den anderen Fällen aber mußten wir noch 0,5 ccm, also im ganzen 2 ccm Digitoninlösung zusetzen. In sieben Fällen hämolysierten dann nach einigen Minuten die Kontrollröhrchen und die Röhrchen mit den größten und kleinsten Bi-Konzentrationen. In den anderen Röhrchen war auch Hämolyse festzustellen, aber nicht in solchem Grade; diese sind weniger durchsichtig, das hinter ihnen gestellte bedruckte Papier war weniger zu lesen. In drei Fällen zeigte die nach einigen Minuten eingestellte Hämolyse die beschriebene Reihenfolge nicht, in zwei Fällen hämolysierten sogar die Kontrollröhrchen mit 0,9 proz. NaCl nicht in gleichem Maße. Aber nach Ablauf von 2 Stunden, nach Abzentrifugierung der Röhrchen, gab es in allen drei Fällen solche Bi-haltige Röhrchen, wo die Farbe nicht so intensiv war, wie bei den am mindesten hämolysierten Kontrollröhrchen.

Jene Konzentrationen, bei welchen das Wismut die Blutkörperchen gegen Saponin schützte, waren etwa gleich den bei dem destillierten Wasser gefundenen. Positive Fälle haben wir zehn, dagegen beobachteten wir in zwei Fällen keine Resistenzerhöhung (Tabelle III).

Tabelle III.

Resistenzerhöhung mit Digitonin hämolysierend.

Nr.	Bismoluolkonzentration	Hämolyse mit Digitonin Verdünnung 1 : 100 000	Blut
1	1 : 1600 bis 1 : 6600	2 ccm	Defibriniert
2	1 : 1600 „ 1 : 8300	2 „	Gewaschene Blutkörperch.
3	1 : 3300 „ 1 : 6600	1,5 „	Defibriniert
4	1 : 1600 „ 1 : 6600	2 „	Gewaschene Blutkörperch.
5	1 : 2500 „ 1 : 10000	2 „	Defibriniert
6	1 : 5000 „ 1 : 10000	2 „	„
7	1 : 2500 „ nicht festgest.	2 „	„
8	Keine Resistenzerhöhung	2 „	„
9	„ „	2 „	„

Nr.	Ammoniumwismutcitrat ccm	Hämolyse mit Digitonin Verdünnung 1 : 100 000	Blut
1	1 : 14 000	2 ccm	Defibriniert
2	1 : 10 000 bis 1 : 22 000	2 „	„
3	1 : 10 000 „ 1 : 24 000	2 „	„

Unsere Ergebnisse kurz zusammengefaßt, glauben wir annehmen zu können, daß das Wismut „in vitro“ in größeren Konzentrationen Hämolyse herbeiführt, in kleineren Konzentrationen Resistenzverminderung hervorruft, in noch kleineren Mengen infolge von Wismutwirkung sich Resistenzerhöhung zeigt und von einer gewissen Konzentration abwärts auf die Blutkörperchen überhaupt nicht wirkt.

Jetzt taucht aber die Frage auf, ob sich die resistenzerhöhende Wirkung unter den schweren Metallen und den ihnen nahe stehenden Körpern nur auf das Arsen und das Wismut beschränkt. Es ist ja bekannt, daß das Hg, Pb, Ur, Co usw. in gewissen Konzentrationen „in vivo“ den Untergang der roten Blutkörperchen bedingen. Darum halten wir es für sehr wahrscheinlich, daß auch diese Körper in kleineren Konzentrationen Resistenzerhöhung hervorrufen können. Allerdings haben wir keine Versuche in dieser Richtung vorgenommen, aber vielleicht stützt diese unsere Meinung die Angabe von *L. v. Liebermann* (6), der in einem Aufsatz erwähnt, daß *Malassez* bei Pb-Anämie Resistenzerhöhung fand.

Da wir wissen, daß die von Arsen ausgeübte gute Wirkung bei der perniziösen Anämie nach unserem heutigen Wissen nur so erklärt werden kann, daß das Arsen die Resistenz der geschwächten Blutkörperchen erhöht, so taucht die Frage auf, *ob man auch das Wismut in die Therapie der perniziösen Anämie einführen könnte.* Die Entscheidung dieser Frage liegt natürlich in der Hand des vorsichtig experimentierenden Klinikers.

In Anbetracht dessen, daß wir beim Bismoluol auch in 1 : 20000 Verdünnung resistenzerhöhende Wirkung sahen, und da ein Mensch von 70 kg ungefähr 5000 ccm Blut hat, würden wir vielleicht bei der Dosis von 0,25 g Bismoluol eine gute Wirkung auf die Anaemia perniciosa beobachten können[1]).

Daß wir in zwei Hundexperimenten trotz der angewandten großen Dosen nur kleine Blutkörperchenzahlverminderung beobachteten, spricht vielleicht auch dafür, daß wir von der Blutkörperchen zerstörenden Wirkung des Wismuts nichts fürchten dürfen.

[1]) Wahrscheinlich werden auch kleinere Mengen genügen, da die Ausscheidung des Wismuts aus dem Körper nur sehr langsam geschieht und so die Dosen eine kumulierende Wirkung ausüben können.

Die mitgeteilten Befunde geben eine neuere und interessante Illustration des in den medizinischen Wissenschaften und in der Kolloidchemie oft bewährten Gesetzes, daß der gleiche Stoff in verschiedenen Konzentrationen eine verschiedene Wirkung ausüben kann.

Literatur.

1) *Gustav Fritz,* Orvosi Hetilap 1923, Nr. 28; *Autenrieth* und *Meyer,* Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 19; *M. Akamanu,* Acta scholae med. Kioto 4, 1921; Ref. Ber. über d. ges. Physiol. **16**, 1923; *Lemay* et *Jaloustre,* C. r. des séances de la soc. de biol. 88, 1923; Ref. Ber. über d. ges. Physiol. **19**, 1923; *H. Müller* und *L. Kürthy,* diese Zeitschr. **149**, 1924; *L. Kürthy,* ebendaselbst **150**, 1924. — 2) *R. Kobert,* Lehrbuch der Intoxikationen **2**, 381, 1906. — 3) *Buntzen,* Om Ernäringen og Blodtabets etc. Kjöbenhavn 1879; Ref. *Gottlieb Meyer,* Exper. Pharmak. 1921, S. 495. — 4) *Gunn,* British Med. Journ., Juli 1908; *Gunn* und *Feltham,* ebendaselbst Januar 1911. — 5) *Kobert,* Z. Werk. — 6) *Leo Liebermann,* Deutsch. med. Wochenschrift, März 1912.

Beobachtungen über die Methylglyoxalase.

Von

Otto Meyerhof.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 14. April 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Frage nach der Durchgangsform, die bei der Spaltung des Zuckers in Milchsäure im Organismus durchlaufen wird, hat die Stoffwechselforscher seit langem lebhaft beschäftigt. Diese Überlegungen bekamen eine bestimmte Richtung durch die bemerkenswerte Entdeckung, die gleichzeitig von *C. Neuberg*[1]) in Deutschland und von *Dakin* und *Dudley*[2]) in Amerika gemacht wurde, daß Methylglyoxal durch tierische Gewebe und Gewebsextrakte mit großer Geschwindigkeit in Milchsäure verwandelt wird. Seit jener Zeit wird von fast allen Autoren, die die Frage diskutieren, mit mehr oder minder großer Wahrscheinlichkeit das Methylglyoxal als unmittelbare Muttersubstanz der im Organismus entstehenden Milchsäure angenommen; einige Forscher haben noch zwischen die Hexose und Methylglyoxal Dioxyaceton oder Glycerinaldehyd eingeschoben, welche von anderen, wie z. B. von *Embden*, *Baldes* und *Schmitz*[3]), als unmittelbare Vorstufe der Milchsäure betrachtet werden. Doch läßt sich feststellen, daß besonders in neuerer Zeit das Methylglyoxal immer mehr in den Mittelpunkt der Diskussion rückt. Auch ist es in der Zwischenzeit *Dakin* sowie *Neuberg* gelungen,

---

[1]) Diese Zeitschr. **49**, 502, 1913; **51**, 484, 1913. *Neuberg* schlägt vor, das hier wirksame Ferment als Ketonaldehydmutase zu bezeichnen.

[2]) Journ. of biol. Chem. **14**, 155, 423, 1913; s. auch *P. A. Levene* und *G. M. Meyer*, ebendaselbst **14**, 551, 1913.

[3]) Diese Zeitschr. **45**, 123, 1912. *Embden* und Mitarbeiter schließen auf diese Verbindungen als Zwischenstufe aus ihrem Befund, daß durch gewaschene Erythrocyten Glycerinaldehyd rascher als Traubenzucker in Milchsäure verwandelt wird. Wenn diese Beobachtung zutrifft, handelt es sich jedenfalls um einen Spezialfall. Nach Versuchen in unserem Laboratorium mit verschiedenen Rattengeweben werden Dioxyaceton und Glycerinaldehyd im Vergleich zum Traubenzucker nur sehr langsam in Milchsäure verwandelt.

Hexosen in Natriumphosphat- oder Bicarbonatlösungen teilweise in Methylglyoxal zu spalten[1]). Aus diesem Grunde habe ich eine Reihe von Versuchen über die Methylglyoxalase angestellt, um festzustellen, ob sich die Vorstellung mit mehr oder minder großer Wahrscheinlichkeit belegen oder ausschließen läßt, daß das Methylglyoxal diese Zwischenstufe darstellt. Als Argument dagegen würde man es z. B. ansehen, wenn die Umwandlung des Methylglyoxals in den Zellen durch Substanzen gehemmt würde, die die Glykolyse nicht beeinflussen, während umgekehrt ein gleichsinniges Verhalten beider Enzyme in möglichst vielen Fällen zugunsten der Hypothese sprechen würde. Ein weiterer Punkt von Interesse in diesem Zusammenhang ist, ob die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung aus Methylglyoxal eine ähnliche Beeinflussung durch den Sauerstoff zeigt, wie sie von mir für die Milchsäurebildung im Muskel[2]) und durch Bakterien[3]), von *Warburg*, *Negelein* und *Posener*[4]) an den verschiedensten glykolysierenden Geweben des Warmblüterorganismus, insbesondere auch am Carcinom gezeigt worden ist: daß nämlich der Sauerstoff die drei- bis sechsfache Menge derjenigen Milchsäure, die durch ihn oxydiert werden könnte, zum Verschwinden bringt.

Tatsächlich hat sich in meinen Versuchen kein Widerspruch zu der Annahme ergeben, daß die Methylglyoxalase einen Teilbestandteil des glykolysierenden Ferments bildet, in ähnlicher Weise wie die Carboxylase einen Bestandteil der Zymase (*C. Neuberg*) darstellt. In physikalisch-chemischer Beziehung besteht eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Verhalten des Atmungsenzyms und wohl auch des glykolytischen Ferments, das in dieser Hinsicht nicht so vollständig untersucht ist. Daß die Umwandlung des Methylglyoxals gegenüber verschiedenen Einwirkungen weniger empfindlich ist als die Glykolyse und diese andererseits bedeutend an Geschwindigkeit übertrifft, wird man in Analogie zur Carboxylase nicht als Argument gegen seine Teilnahme an der Glykolyse anführen. Andererseits hat sich ein *bindender* Beweis für diese Annahme nicht ergeben. Gleichzeitig wurde die katalytische Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure in neutraler Lösung studiert. Bisher war in dieser Richtung nur die Einwirkung der OH-Ionen bekannt, während nach *Denis*[5]) in neutraler Lösung erst bei 24stündiger Erwärmung auf 100° eine teilweise Bildung von Milchsäure erfolgt.

---

[1]) *Dakin* u. *Dudley*, Journ. Biol. chem. **15**, 135, 1913. *Neuberg*, diese Zeitschr. **55**, 495, 1913; **71**, 144, 1915.

[2]) Zusammenfassung Ergebn. d. Physiol. **22**, 328, 1923.

[3]) *O. Meyerhof* und *P. Finkle*, Chemie der Zellen und Gewebe **12**, 157, 1924.

[4]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

[5]) Amer. Chem. Soc. **38**, 584.

Methoden.

Als Methylglyoxal benutzte ich solches, das nach der neuen Vorschrift von *Hermann O. L. Fischer* und *C. Taube*[1]) dargestellt wurde. Herr Dr. *H. L. O. Fischer* war so liebenswürdig, mir zwei frische Präparate herzustellen. Ein drittes nach der gleichen Vorschrift erhielt ich von Herrn Dr. *Schoeller*, in Firma Schering-Werke. Beiden Herren bin ich hierfür zu Dank verpflichtet. Das Methylglyoxal wurde in konzentrierter Lösung auf Eis gehalten. Während 2 bis 3 Wochen bleibt es so für die Versuche brauchbar und erleidet nur eine langsam fortschreitende Zersetzung, teilweise in Säure (Milchsäure oder Brenztraubensäure). Späterhin treten andere giftige Umwandlungsprodukte auf, so daß die Präparate für Versuche an Geweben möglichst frisch verwandt werden müssen. Die Stammlösungen wurden mit NaCl- oder Ringerlösung verdünnt.

Zur Messung der Milchsäurebildung dienten die von *Warburg*[2]) für die Glykolyse beschriebenen Methoden. Daß es sich hier bei der Bildung der Säure wirklich nahezu oder ganz ausschließlich um Milchsäure handelt, konnte durch Übereinstimmung des Endwertes der Säurebildung unter anaeroben und aeroben Bedingungen und gleichzeitigem annähernden oder vollständigen Verschwinden der Reaktion von Methylglyoxal mit Piperidin und Natriumnitroprussid[3]) festgestellt werden. Da Brenztraubensäure diese Reaktion ebenfalls zeigt, kommt eine Bildung von Brenztraubensäure in größerer Menge nicht in Frage. Die Gesamtausbeute Milchsäure bei totaler Umwandlung des Methylglyoxals war, soweit kontrolliert, immer etwas geringer, als sie der Berechnung nach hätte sein sollen, und nahm noch mit dem Aufbewahren der Präparate ab, so daß sie im allgemeinen etwa 80 Proz., später nur noch etwa 60 Proz. des berechneten Wertes betrug, was jedenfalls auf die allmähliche Zersetzung zu beziehen ist.

Die Gewebsschnitte wurden nach den Angaben *Warburgs* angefertigt. Ihre Dicke betrug 0,2 bis 0,4 mm; ihr Gewicht wurde nach dem Trocknen bei 100° auf einer *Sartorius*schen Mikrowage bestimmt. Die gebildete Milchsäure ist in Kubikmillimetern ausgetriebener Kohlensäure angegeben, indem 1 cmm $CO_2 = 0{,}004$ mg Milchsäure ist. In Analogie zu den Glykolyseversuchen ist hier der Q_{CO_2}-Wert nach *Warburg* (Kubikmillimeter CO_2 pro Milligramm Trockengewicht und Stunde) berechnet worden.

Im folgenden werden beschrieben:

1. Versuche an Gewebsschnitten,
2. Versuche an Gewebsauszügen,
3. Modellversuche (katalytische Umwandlung des Methylglyoxals).

I. Versuche an Gewebsschnitten.

Als Gewebe zum quantitativen Studium der Methylglyoxalumwandlung empfiehlt sich ein solches, das in Abwesenheit von zugesetztem Zucker keine meßbare spontane Milchsäurebildung zeigt.

---

[1]) Berlin. Ber. **57**, 1502, 1924.

[2]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923; **152**, 51, 1924.

[3]) *C. Neuberg*, ebendaselbst **71**, 150, 1915.

also z. B. nicht der Muskel oder die Leber mit ihrem beträchtlichen Kohlehydratgehalt. Allerdings überwiegt auch bei diesen die Milchsäurebildung aus Methylglyoxal bedeutend diejenige aus den präformierten Kohlehydraten. Besonders geeignet erwies sich graue Gehirnsubstanz, die in Gegenwart von Zucker besonders stark glykolytisch wirksam ist, aber in Abwesenheit desselben nur Spuren Milchsäure produziert.

Die Geschwindigkeit der Milchsäureproduktion aus Methylglyoxal durch Gewebsschnitte ist größer als die der Glykolyse in Gegenwart von zugesetztem Zucker. Nach *Warburg* beträgt die letztere, ausgedrückt als Q_{CO_2} in Stickstoff für Gehirn 19,1, für Leber 3,3. Für Muskel (Zwerchfell), bei dem es richtiger ist, die gebildete Milchsäure chemisch zu bestimmen, ergibt sich umgerechnet unter gleichen Bedingungen auch ein Q_{CO_2}-Wert von 3 bis 4. Dagegen ist Q_{CO_2} bei mittleren Konzentrationen von Methylglyoxal für Gehirn 45 bis 50, für die Leber 30, für Zwerchfell etwa 15. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben, insbesondere dem Gehirn einerseits, dem Zwerchfell andererseits, sind zwar auch bei der Methylglyoxalzersetzung ausgesprochen. Doch möchte ich es dahingestellt sein lassen, ob dies nicht auf sekundären Effekten, wie dem verschieden guten Eindringen und einer verschiedenen Giftempfindlichkeit gegenüber der Substanz oder ihren Umwandlungsprodukten beruht. Aus demselben Grunde sind auch die mit verschiedenen Präparaten erhaltenen Geschwindigkeiten nicht genau gleich. Mit dem vermutlich besten, das nach der Destillation unmittelbar zu 28 Proz. in Wasser gelöst und in den folgenden Tagen benutzt wurde, ergab sich als maximale Geschwindigkeit mit Gehirnsubstanz in m/50 bis m/150 Lösung, $Q_{CO_2} = 50$ bis 55, während der Wert sowohl nach höheren wie niederen Konzentrationen abfiel. Beispiele hierfür sind in der Tabelle I enthalten. In Nr. 2 und 3 der Tabelle sind je zwei Versuche aufgeführt, von denen der eine nach der neuen Glykolysemethode von *Warburg* („Kästchenmethode“) ausgeführt ist, bei dem anderen aber die gebildete fixe Säure aus der Differenz des Bicarbonatgehalts zu Beginn und Schluß bestimmt ist. Dies geschieht so, daß in einer mit der gleichen Lösung beschickten Kontrolle zu Versuchsbeginn und zweitens in dem Versuchsgefäß selbst zum Schluß durch Einkippen von Salzsäure aus dem sackförmigen Anhang der Respirationsgefäße das gesamte in der Lösung befindliche Bicarbonat in Freiheit gesetzt wird. Man sieht, daß die nach beiden Methoden erhaltenen Resultate vollständig übereinstimmen.

Daß trotz der starken Wirksamkeit das Methylglyoxal für die Zelle giftig ist, ergibt sich aus der Atmungshemmung. Diese beträgt —

Tabelle I.

Gehirnschnitte in Ringer-Bicarbonat mit Methylglyoxal.

Gasraum 5 Proz. Kohlensäure in N_2.

Nr.	Gehirn mg	Zeit	Methylglyoxal-konzentration Mol.	CO_2 cmm	Q_{CO_2}	Methode
1	2,03	1h	0	1,5	—	Kästchen
	2,25	1	0,0066	94	42	"
	2,57	1	0,020	137	53,5	"
	3,03	1	0,040	94	31	"
2	1,96	1h 30′	0,0033	65	22	Kästchen
	1,97	1 30	0,0033	64,5	22	Umkippmethode
3	1,89	1h	0,010	91,5	48,5	Kästchen
	1,87*)	1	0,010	92	49	"
	1,22	1	0,010	56	50	Umkippmethode

*) Gemisch 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff.

bei den verschiedenen Präparaten etwas verschieden — im allgemeinen in m/100 Lösung gut 50 Proz., während Konzentrationen unter 0,005 ohne stärkere Wirkung sind. Für die Frage, ob der Sauerstoff einen ähnlichen Einfluß auf die Methylglyoxalzersetzung durch Gewebe hat wie die Glykolyse, könnten daher nur Konzentrationen unter m/200 verwandt werden. Mit diesen ist es, zumal der Methylglyoxalgehalt durch die Zersetzung rasch sinkt, nicht ganz leicht, in mehreren Parallelversuchen mit verschiedenen Gewebsstücken und Flüssigkeitsvolumina übereinstimmende Resultate zu erhalten, so daß gewisse Schwankungen der Zersetzungsgeschwindigkeit auftreten. Diese liegen jedoch nach beiden Seiten, ob die Milchsäurebildung in Sauerstoff-Kohlensäure- oder Stickstoff-Kohlensäuregemischen gemessen wurde, und es folgt, daß der Sauerstoff die Geschwindigkeit nicht ändert. Einige Versuche sind auf der Tabelle II wiedergegeben. In den Versuchen mit Zwerchfell und Leber Nr. 1, 2 und 3 ist zwar die Milchsäurebildung in Stickstoff deutlich erhöht. Doch beruht dieses, wie Versuch 3 zeigt, auch nur auf dem Unterschiede zwischen der anaeroben und aeroben Glykolyse, die auch ohne Methylglyoxal stattfindet. Dagegen schwanken die Resultate mit Gehirnsubstanz nach beiden Richtungen.

Während Natriumfluorid, das die Glykolyse schon in kleinen Konzentrationen hemmt, auf die Methylglyoxalase nur schwach wirkt, stimmen die narkotischen Konzentrationen in beiden Fällen überein[1].

[1]) Über die narkotische Hemmung der Glykolyse wird Herr Dr. *Loebel* aus unserem Laboratorium demnächst berichten.

Tabelle II.

Milchsäurebildung aus Methylglyoxal in Sauerstoff-Kohlensäure- und Stickstoff-Kohlensäuregemischen.

Nr.	Gewebe	Versuchsdauer	Methylglyoxalkonzentration Mol.	Methode	Q_{O_2} (Atmung)	Q_{CO_2} in Stickstoff	Q_{CO_2} (Extrakohlensäure) in O_2
1	Zwerchfell	1h 30'	0,004	Kästchen	4,77	4,77	3,15
2	Leber	1 30	0,004	„	13	17,0	15,0
3	„	1 30	0	alte Methode	8,8	6,0	1,0
			0,005	„	7,6	19,6	14,9
4	Gehirn	1	0,01	Kästchen	4,0	25,0	34,0
5	„	1 15	$<$ 0,005	alte Methode	5,9	17	14
6	„	1	0,005	Kästchen	4,1	16,6	13,2
7	„	1 10	$<$ 0,005	alte Methode	6,9	12,2	17

In der Tabelle III ist eine Reihe von Versuchen mit Narkotica verzeichnet.

Tabelle III.

Narkotische Hemmung der Milchsäurebildung aus Methylglyoxal.

Nr.	Gewebe	Methylglyoxalkonzentration Mol.	Versuchsdauer	Narkoticumzusatz	Proz.	Q_{CO_2} in Stickstoff	Hemmung Proz.
1	Gehirn	0,01	1h	—	—	30,5	—
				Äthylurethan	10	3,0	90
2	„	$<$ 0,005	1	—	—	14,2	—
				Äthylurethan	4	8,5	40
				Phenylurethan	gesättigt	5,1	65
3	„	$<$ 0,005	1h 15'	—	—	17	—
				Thymol	0,01	11	35
4	„	0,01	1h	—	—	42	—
				Heptylalkohol	gesättigt	6,5	85
5	Zwerchfell	0,008	1h 30'	—	—	13	—
				Äthylurethan	8	4,9	63
				Heptylalkohol	gesättigt	4,6	65

II. Versuche mit Gewebsextrakten.

Bereits *Neuberg* sowie *Dakin* und *Dudley* haben festgestellt, daß die Milchsäurebildung auch durch zellfreie Extrakte aus Leber und Muskulatur bewirkt werden kann. In der Tat gelingt es leicht, stark wirksame Extrakte aus verschiedenen Geweben herzustellen. Merkwürdigerweise verliefen bei mir Versuche mit Rattenleber negativ, dagegen positiv mit Muskulatur und Gehirn. Die Muskulatur wurde fein zerschnitten, mit der dreifachen Menge isotonischer NaCl- oder KCl-Lösung versetzt, 1 Stunde in der Schüttelmaschine geschüttelt, durch Papier filtriert, der ablaufende Saft zentrifugiert und die klare, rötlich gefärbte, wässerige Lösung be-

nutzt. Die Gehirnsubstanz wurde mit der dreifachen Menge KCl-Lösung in der Reibschale zerrieben, dann ebenfalls scharf zentrifugiert und die überstehende Lösung verwandt. Besonders wirksam war Gehirnsubstanz. Noch in vierfacher Verdünnung setzt der frisch hergestellte Extrakt eine m/100 bis m/200 Lösung von Methylglyoxal in 1 Stunde bei 38° zu über drei Viertel um. Die Methylglyoxalase zeigt in physikalisch-chemischer Hinsicht ein ganz ähnliches Verhalten wie das Atmungsenzym. *Otto Warburg* hat gezeigt, daß man zellfreie, strukturlose Extrakte aus Leber, Seeigeleiern und anderem Material erhalten kann, die atmen und deren Oxydation durch Narkotica gehemmt wird, ähnlich wie auch die Gärung im Hefepreßsaft, wobei die Hemmungen aber schwächer als die der Zellatmung und Zellgärung selbst sind. Die „Safthemmung" unterscheidet sich von der „Strukturhemmung" besonders stark bei den höchsten Gliedern der homologen Reihe[1]). Ferner ist die Wirkung an den Eiweißgehalt der Extrakte gebunden. Bei Filtration durch Berkefeldkerzen ist die erste eiweißarme Filtratportion wirkungslos, der spätere eiweißreiche Anteil wirksam. Dasselbe Verhalten zeigt auch die Methylglyoxalase. Einige Versuche mit narkotischen Substanzen sind in der Tabelle IV zusammengestellt. In der letzten Spalte sind noch einmal die Hemmungen der gleichen Substanzen am Gewebe selbst angeführt.

Tabelle IV.
Narkotische Hemmungen im Gewebsextrakt.

Nr.	Gewebsextrakt	Methylglyoxalkonzentration Mol.	Versuchsdauer	Zusatz	Konzentration des Zusatzes	CO_2 cmm	Hemmung Proz.	Hemmung im Gewebe Proz.
1	Gehirn	0,008	1h	—	—	83	—	—
				Heptylalkohol	gesättigt	76,5	8	85
2	Muskel	0,008	2	—	—	98	—	—
				Äthylurethan	8 Proz.	63	36	63
				Heptylalkohol	gesättigt	92	6	65
3	„	0,01	1h 25′	—	—	68	—	—
				Amylalkohol	2 Proz.	45	33	fast 100*)

*) Diese Zahl ist in der Arbeit von *Dorner* (unter *Warburg*) für die Gärung lebender Hefe festgestellt, während die Hemmung im Hefepreßsaft durch 2 Proz. Amylalkohol 46 Proz. beträgt.

Ein Teil einer größeren Menge von Muskelextrakt wurde durch eine Berkefeldkerze von 10 cm Länge und 5 ccm Inhalt mit der Wasserstrahlpumpe durchgesaugt. Die ersten beiden Anteile des Extrakts zu je 3 ccm waren fast eiweißfrei und gegenüber Methylglyoxal wirkungs-

[1]) *Otto Warburg*, Pflügers Arch. **154**, 599, 1913; **158**, 19, 1914. Ergebnisse d. Physiol. **14**, 253, 1914.

los. Der vierte Anteil dagegen war bereits sehr eiweißreich, und seine enzymatische Wirkung unterschied sich nicht deutlich von dem unfiltrierten Saft.

Infolge der weitgehenden Analogie mit dem Atmungsenzym lag die Frage nahe, ob auch hier ein ultrafiltrierbares und kochbeständiges Koenzym wie bei der Atmung nachweisbar ist[1]). Dies ist nun zwar nicht der Fall, denn wohl wird bei der Ultrafiltration und Waschung der Rückstand allmählich in seiner enzymatischen Kraft geschwächt, doch besitzt das unverdünnte Ultrafiltrat nicht die Fähigkeit, denselben zu reaktivieren. Auf der anderen Seite zeigt sich aber, daß der Kochsaft von Gehirnsubstanz und Muskulatur eine starke Aktivierung der Methylglyoxalase bewirkt, während er direkt das Methylglyoxal nicht angreift. Kocht man das Gewebe selbst oder auch den Extrakt auf und gibt ein gleiches Volumen Kochsaft zum frischen Extrakt, so wird die Geschwindigkeit des Methylglyoxalumsatzes mindestens verdoppelt. Einige Beispiele hierfür sind in der Tabelle V gegeben. In der letzten Zeile Versuch 1 und 4 ist je ein Versuch mit Kochsaft allein angeführt.

Tabelle V. Aktivierung der Methylglyoxalase durch Gewebskochsaft.

Nr.	Gewebsextrakt	ccm	Methylglyoxalkonzentration Mol.	Gesamtflüssigkeit	Zusatz	ccm	Zeit	CO_2 cmm	Steigerung Proz.
1	Muskel	0,9	0,008	2,0	—	—	45'	30	—
	„	0,9	0,008	2,0	Muskelkochsaft	0,9		107	230
	„	—	0,008	2,0	„	0,9		1	—
2	Gehirn	0,5	0,008	2,0	—	—	65	42	—
	„	0,5	0,008	2,0	Muskelkochsaft	0,7		163	300
3	Muskel-Ultrafiltrationsrückstand	0,5	0,008	3,0	—	—	1h	43	—
		0,5	0,008	3,0	Muskelkochsaft	1,75		190	350
		0,5	0,008	3,0	Ultrafiltrat	1,75		44	0
4	Gehirn	0,8	0,008	2,0	—	—	1	87,5	—
	„	0,8	0,008	2,0	Gehirnkochsaft	0,8		169	80*)
	Gehirn-Ultrafiltrationsrückstand	1,0	0,008	2,2	—	—		28	—
		1,0	0,008	2,2	Gehirnkochsaft	0,8		53	50*)
		1,0	0,008	2,2	Ultrafiltrat	0,8		27	0
		—	0,008	2,2	Gehirnkochsaft	0,8		11	—

*) Ab Korrektur für Kochsaft.

III. Modellversuche.

Methylglyoxal ist eine ziemlich unbeständige Substanz. Es nimmt daher nicht wunder, daß sie unter Bedingungen, die allgemein die Stabilität gegenüber dem Sauerstoff herabsetzen, rasch oxydiert wird. Während eine m/20 Lösung von Methylglyoxal für sich allein in 1 Stunde nicht deutlich Sauerstoff verbraucht, wird sie an der Oberfläche von

[1]) *O. Meyerhof*, Hoppe-Seilers Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 165, 1918; **102**, 1, 1918.

Tierkohle oxydiert. 2 ccm einer derartigen Lösung nehmen z. B., mit 0,1 g *Merck*scher Blutkohle in Sauerstoff geschüttelt, in 1 Stunde 120 cmm Sauerstoff auf. Die Geschwindigkeit ist an der gleichen Kohle ähnlich groß wie für die Oxydation von Leucin[1]). Trotzdem handelt es sich hier um einen anderen Vorgang, wahrscheinlich eine unspezifische Verdichtung an der Oberfläche, denn n/1000 Blausäure hemmt die Oxydation nicht, sondern beschleunigt sie sogar[2]) (Blausäure selbst ruft keine meßbare Oxydation des Methylglyoxals hervor). Ähnlich wie Kohle verhält sich konzentrierte, neutrale Phosphatlösung, in der Fructose rasch oxydiert wird[3]). Während dies nach *Meyerhof* und *Matsuoka*[4]) ebenfalls auf einer Metallkatalyse beruht, gilt dasselbe offenbar nicht für die Oxydation des Methylglyoxals. Denn auch hier ruft Blausäure eine starke Steigerung der Oxydation hervor, während andererseits der Zusatz von Metall ohne Einfluß ist.

Interessanter erscheint in unserem Zusammenhang die Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure. Ich machte die Feststellung, daß sehr geringe Konzentrationen von Blausäure in neutraler Lösung katalytisch eine Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure bewirken. Es handelt sich hierbei nicht etwa, wie man denken könnte, um die bekannte Additionsreaktion des Aldehyds mit dem zugesetzten Cyankali, sondern um eine Katalyse[5]). Denn $5 \cdot 10^{-5}$ mol. KCN wandelt bereits in weniger als 1 Stunde bei 38° über die hundertfache Menge Methylglyoxal in Milchsäure um. Wie es bei einer echten Katalyse zu erwarten ist, ist die Geschwindigkeit des Vorganges direkt der Konzentration des Katalysators proportional. Da der Verlauf des Umsatzes durch gewisse Nebenreaktionen kompliziert zu sein scheint, tritt dieser Zusammenhang am deutlichsten zutage, wenn man die Zeiten des halben Umsatzes miteinander vergleicht.

Diese betragen z. B.:

Versuch		Konzentration	Zeit
Versuch I:	für	$2 \cdot 10^{-4}$ mol.	5 Minuten
	„	$1 \cdot 10^{-4}$ „	10 „
„ II:	„	$2 \cdot 10^{-4}$ „	5,5 „
	„	$1 \cdot 10^{-4}$ „	11,0 „
	„	$5 \cdot 10^{-5}$ „	18 „
„ III:	„	etwa $1 \cdot 10^{-4}$ mol. .	15 „
	„	„ $5 \cdot 10^{-5}$ „ .	27,5 „
	„	„ $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ „ .	54 „

1) *O. Warburg* und *Negelein*, diese Zeitschr. **118**, 257, 1921.

2) Für die Oxydation der Blausäure selbst an Tierkohle ist eine Korrektur in Abzug gebracht.

3) *O. Warburg* und *Yabusoe*, diese Zeitschr. **146**, 380, 1924.

4) Ebendaselbst **150**, 1, 1924.

5) Vielleicht ähnlich der Cyankatalyse der Benzoinkondensation bei aromatischen Aldehyden.

Der Verlauf ist auf den Abb. 1 bis 3, die drei Versuche wiedergeben, dargestellt. Am Anfang gilt wenigstens angenähert die Gleichung der monomolekularen Reaktion, wofür in der Tabelle VI Beispiele für Versuch I, 2 und für die Versuche III, 1 und 2 gegeben sind. Im allgemeinen steigt K in der ersten Reaktionshälfte, um dann weit unter den Anfangswert zu sinken.

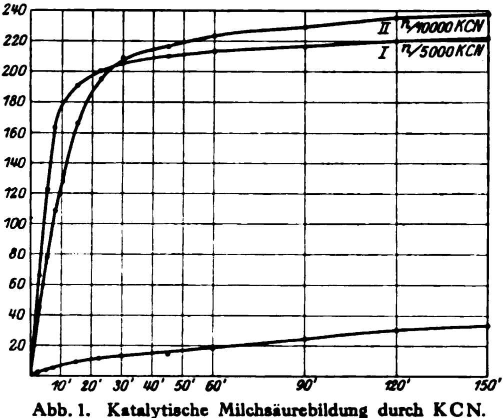


Abb. 1. Katalytische Milchsäurebildung durch KCN. Ordinate: cmm CO_2. Unterste Kurve: ohne Zusatz.

Als Anfangskonzentration ist die in toto erhaltene Kohlensäuremenge benutzt worden. Da der Umsatz aber nicht komplett ist, ist schon aus diesem Grunde die Berechnung wenig genau.

In der späteren Zeit verlangsamt sich der Umsatz immer mehr, ohne einen scharfen Endpunkt zu erreichen. Es scheint, daß außer

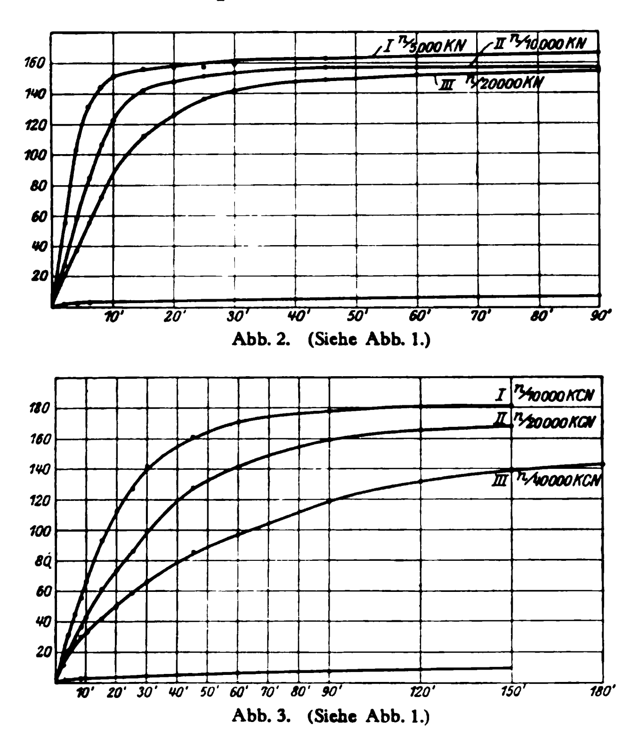


Abb. 2. (Siehe Abb. 1.)

Abb. 3. (Siehe Abb. 1.)

Tabelle VI.

Reaktionsgeschwindigkeit, für den katalytischen Umsatz des Methylglyoxals mit KCN, für den Hauptanteil der Kurven bestimmt.

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{A - x_1}{A - x_2} .$$

Nr.	KCN-Konzentration	Zeitintervall Min.	Methylglyoxal-konzentration cmm CO_2	0,4343 . k
			240	
I	$1 . 10^{-4}$ n	2,5	195	3,35
		2,5	161	3,05
		2,5	131	3,28
		2,5	112	2,56
		5	74	3,08
		7,5	45	2,22
			182	
III, 1	$1 . 10^{-4}$ n	10	116	1,94
		10	70	2,23
		10	41	2,43
		15	21	2,01
		15	11	2,01
			182	
III, 2	$5 . 10^{-5}$ n	10	140	0,87
		10	109	1,07
		10	83	1,25
		15	55	1,19
		15	41	0,95
		30	24	0,84

Milchsäure auch noch andere Produkte entstehen, indem die Reaktion mit Piperidin und Natriumnitroprussid zwar sehr abgeschwächt wird, aber nicht vollständig aufhört. Andererseits ergibt sich bei Totalumsatz des Methylglyoxals einerseits mit Gehirnextrakt, andererseits mit Blausäure, derselbe Endwert (im ersten Falle verschwindet die Natriumnitroprussidreaktion vollständig). Sauerstoff hat auf den Verlauf keinen Einfluß; ebensowenig die Zugabe von Milchsäure.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß zu Beginn 0,4 ccm einer etwa 0,02 mol. Methylglyoxallösung, die sich in dem sackförmigen Anhang der Respirationsgefäße befand, in 1,6 ccm einer NaCl-Lösung, die Bicarbonat und wechselnde KCN-Mengen enthielt, eingekippt wurde. Die Differenz der erreichten Endwerte innerhalb desselben Versuchs ist wohl auf Ungenauigkeiten in der Abmessung der Methylglyoxallösung sowie der Bestimmung der Gefäßkonstanten zurückzuführen. Die unterste Kurve der Abbildungen zeigt die Zersetzung ohne Blausäurezusatz. Diese ist nur in Versuch I stärker, wo eine schon vor längerer Zeit hergestellte Lösung benutzt wurde.

Fassen wir die Resultate zusammen, so ergibt sich, daß die Milchsäurebildung aus Methylglyoxal im Gegensatz zur Glykolyse durch die gleichzeitige Atmung nicht gehemmt wird. Sie ähnelt andererseits

den typischen Stoffwechselreaktionen in physikalisch-chemischer Beziehung: Für die Hemmungen in der Zelle gelten die „Strukturwirkungsstärken“ der Narkotica, während für die Hemmung in den Zellextrakten die „Saftwirkungsstärken“ der Narkotica maßgebend sind. Die enzymatische Wirkung ist, wie die Filtration durch Berkefeldfilter ergibt, an den Eiweißgehalt der Extrakte gebunden. Ferner verstärkt Gewebskochsaft die enzymatische Wirkung beträchtlich, ohne daß aber ein ultrafiltrierbares Koferment vorhanden ist. Katalytisch läßt sich die Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure in neutraler Lösung durch Blausäure in sehr geringen Konzentrationen, $2 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$, herbeiführen, wobei die Geschwindigkeit der Konzentration des Katalysators proportional ist.

Zur Physiologie und Chemie der Pflanzenphosphatide.

Von

V. Grafe (Wien).

(Aus dem chemischen Laboratorium der Neuen Wiener Handelsakademie.)

(Eingegangen am 14. April 1925.)

Während durch die zahlreichen Untersuchungen *E. Schulzes*[1]) und seiner Schule das stete und reichliche Vorhandensein von phosphorhaltigen Lipoiden und phosphorfreien, aber kohlehydrathaltigen Cerebrosiden nachgewiesen wurde, erschienen diese doch immer nur als Reservestoffe in den entsprechenden Pflanzenorganen, ohne daß man ihnen eine ähnlich wichtige Rolle im Mechanismus der Zellvorgänge hätte zuerkennen mögen, wie das bei den Phosphatiden des Tierkörpers schon seit verhältnismäßig langer Zeit geschehen ist.

Erst durch die ausgedehnten Untersuchungen *B. Hansteen Cranners*[2]) wurde die Tatsache nachdrücklich hervorgehoben, daß die Phosphatide nicht nur keiner Pflanzenzelle fehlen, daß sie auch nicht nur als Reservestoff auftreten, sondern daß sie für Plasma und Zellwand als Konstituenten dieselbe Wichtigkeit besitzen wie die Proteine und Kohlehydrate.

---

[1]) *E. Schulze*, Chem.-Ztg. **32**, 981, 1908; Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 54, 1907; **55**, 341, 1908; **60**, 155, 1909; *E. Schulze* und *G. Trier*, ebendaselbst **59**, 233, 1909; **76**, 258, 1911; **79**, 235; **81**, 53, 1912; **67**, 59, 1910; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **42**, 4654, 1909; *E. Schulze*, *Frankfurt* und *Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 239, 1910; *E. Schulze* und *Winterstein*, ebendaselbst **40**, 101, 1903; *E. Schulze* und *A. Likiernik*, ebendaselbst **15**, 405, 1891; *E. Schulze* und *S. Frankfurt*, Landw. Versuchsstat. **43**, 307, 1894; *E. Schulze* und *Hiestand*, Dissertation Zürich; Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 496, 1906; **54**, 288, 1907; *E. Winterstein* und *Smolenski*, ebendaselbst **58**, 506, 1909; *E. Schulze* und *Stegmann*, ebendaselbst **58**, 527, 1909; *G. Trier*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 383, 1911; **77**, 290, 1912; **76**, 258, 496, 1912; **80**, 409, 1912; **85**, 372; **86**, 1, 141, 153, 407, 1913; *Vl. Njegovan*, ebendaselbst **76**, 1, 1911.

[2]) *B. Hansteen Cranner*, Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landbrukshøiskole **2**, H. 1/2, 1922.

Die für die biologische Lipoidforschung wichtigste, durch *Hansteen Cranner* gewonnene Erkenntnis besteht wohl darin, daß er nachweisen konnte, daß Wurzeln und andere Zellgewebe der verschiedensten Pflanzen an reines Wasser schon bei den Temperaturen des Lebens massenhaft wasserlösliche und wasserunlösliche Phosphatide abgeben, und daß diese sowohl im Plasma als in der Zellwand als die Bildner der Grenzschichten für die Permeabilitätsverhältnisse der Zelle maßgebend sind.

Ihre ausgeprägte Veränderlichkeit unter dem Einfluß unerheblich erhöhter Temperaturen, Licht, Luft und sonst indifferenter Solventien wie Alkohol, Äther, Aceton läßt sie als Konstituenten von Plasmamembran und Zellwand besonders geeignet erscheinen. Dazu kommt noch, daß sie sich leicht mit Elektrolyten und Nichtelektrolyten zu größeren Komplexen verbinden, und daß sie sich auch gegenseitig binden; daher gelingt eine Trennung mancher wasserlöslicher Phosphatide in ihre verschiedenen Fraktionen erst nach systematischer Entfernung der einzelnen, die sich gegenseitig in Lösung halten. Die wasserunlöslichen, aber stark hydrophilen Phosphatide mögen die plasmatischen Grenzschichten bilden und von hieraus die Zellwände durchdringen; durch diese Barriere vermögen leicht nur Wasser und wasserlösliche Phosphatide zu passieren, die demnach, da ihre Molekülkomplexe beweglich sind[1]), als Vehikel für Aschensubstanzen, Zucker usw. zu dienen imstande sind. Die Phosphatide der Grenzschichten reagieren dann mit den permeierenden Substanzen unter Veränderung der eigenen Permeabilität, so daß beispielsweise der plasmolytische Versuch niemals rein physikalischer Deutung fähig ist, da eben das Plasmolytikum stets auch physiologische Änderungen bewirkt. Besonders auffallend und auch im extrazellulären Experiment bei den Phosphatiden nachzuahmen ist die Verfestigung der Zellkonstituenten durch H-Ionen und Erdalkalisalze, während OH-Ionen und Alkalisalze im Gegenteil verflüssigend wirken. Die Phosphatide sind offenbar artspezifisch, vielleicht sogar organspezifisch zusammengesetzt, sie ändern sich ferner mit dem Vegetationszustand des Organs, wodurch sich die jahreszeitlichen und Altersschwankungen der Permeabilität, letztere mit kolloiden Alterserscheinungen, erklären würden. Nun sind aber die bisher bei höherer Temperatur und mit den verschiedensten Lösungsmitteln gewonnenen Phosphatide sicherlich nicht mehr in demselben Zustand, in welchem sie in der Zelle auftreten, was aus folgendem Versuch hervorgehen dürfte:

Legt man mit einem scharfen Messer geschnittene, sorgfältig mit großen Mengen Leitungswasser ausgewaschene Schnitte aus den frischen

[1]) *L. Loewe*, diese Zeitschr. 41, 204, 1912.

Wurzeln der Rübe in Schalen so in destilliertes Wasser, daß dieses die Schnitte eben bedeckt und läßt das Gefäß bei höchstens 10^0 in einem dunklen Raum 24 Stunden stehen, so erscheint nach dieser Zeit das Wasser völlig klar, die Schnitte völlig weiß und turgeszent. Das Wasser, das nunmehr reichlich wasserlösliche Phosphatide enthält, wird andauernd mit Äther geschüttelt, die ätherische Schicht abgetrennt und der Äther verdunstet. Der farblose Rückstand löst sich nun nicht mehr in Wasser und ist von diesem nicht benetzbar, wohl aber löst er sich leicht in organischen Lösungsmitteln. Bei 30^0 treten aus den Schnitten auch wasserunlösliche Phosphatide aus, die im Wasser eine milchige Suspension bilden. Diese gequollenen Phosphatidflocken lösen sich auch in Spuren nicht in Alkohol oder Äther, wohl aber nachdem sie analytisch behandelt worden sind.

Nach *Hansteen Cranner*[1]) gelingt es außerdem auch, einzelne wasserlösliche Phosphatide durch fraktionierte Bleifällung in verschiedene Partien mit differentem P : N-Verhältnis zu trennen. Zwei verschiedene Phosphatide erhielt er durch Fällung mit $AlCl_3$, ein anderes durch Ca-Acetat. Die unlöslichen Fraktionen können in die löslichen bis zu einem durch Temperaturverschiebungen bestimmten Gleichgewicht übergehen. Aus den folgenden experimentellen Erfahrungen an den Phosphatiden der Zuckerrübe ist allerdings zu ersehen, daß hier solche Trennungen nicht möglich sind. Dagegen zeigt es sich, daß die Phosphatide (unlösliche) sich Kernfarbstoffen und Doppelfärbungen gegenüber genau so verhalten wie die chromatische Substanz des Zellkerns, auch sonst zeigen dieselben gleiche Reaktionen wie die Nucleine des Zellkerns, so daß die Vermutung naheliegt, die Nucleinreaktionen des Zellkerns rührten vom Stickstoffkomplex der Phosphatide und nicht von Eiweißkörpern her. Der Zellsaft aber besteht aus löslichen Phosphatiden, die immer bis zu einer bestimmten Gleichgewichtslage von der chromatischen Substanz, d. h. von den unlöslichen Kernphosphatiden, abgegeben werden. Diese löslichen Kernphosphatide können dann ins Cytoplasma herausdiffundieren und hier das Material für die Plasmamembran und für die Zellwände abgeben, da sie stets Wandmaterial in Form von Pektinen und anderen Kohlehydraten mit sich führen. Nachgewiesen wurde ferner der Besitz von Leukobasen der Anthocyane und anderer Anlagen für erbliche mendelnde Merkmale. Nach *Hansteen Cranner* ist der Zellkern der Sitz für den synthetischen Aufbau der Zellphosphatide, wodurch ihr artspezifischer Charakter erklärt wäre. Manche der isolierten Phosphatide werden von Traubenzuckerlösungen in Konzentrationen n/2 bis n

[1]) Briefliche Mitteilung *Hansteen Cranners* an mich vom 5. November 1924.

gefällt. Nach *Haberlandt* strahlen seine Zellteilungshormone vom Zellkern aus, ebenso wie auch die Phosphatide von ihrem Bildungsherd im Zellkern in das Zellmilieu herausdiffundieren. Es ist naheliegend, an Beziehungen derselben mit den Zellteilungshormonen zu denken.

Aber noch eine andere wichtige Frage steht im Zusammenhang mit der Phosphatidforschung, die der Vitamine. Die bisherigen Versuche einer Isolierung der hierhergehörigen Stoffe haben fast durchwegs Mißerfolge aufzuweisen gehabt, da die Restfraktionen, in denen man die wirksamen Stoffe dieser Gruppe suchte, alle möglichen Spaltungsprodukte plasmatischer Substanzen enthalten, von denen bald die einen bald die anderen einen Teil der gesuchten Wirksamkeit aufzuweisen hatten, ohne daß die Frage nach der Identität des betreffenden Vitamins damit einer Lösung zugänglich gemacht worden wäre. Ebenso unzulänglich erweisen sich die von manchen Autoren verwendeten, auf Beeinflussung der Hefegärung beruhenden Methoden zur Untersuchung wasserlöslicher Vitamine. Erst kürzlich hat *Euler*[1]) in einer sehr interessanten Arbeit zeigen können, daß eine scharfe Grenze zu ziehen ist zwischen der Co-Zymase der Hefe und des Muskels einerseits und den durch ihre Zuwachswirkung auf Mikroorganismen oder höhere Tiere und durch ihre antineuritische Wirkung gekennzeichneten Stoffe andererseits. „Selbst kräftige Zuwachsfaktoren kommen als Aktivatoren der Gärung in Zusammenwirkung mit dem Co-Enzym der Hefe nur in ganz untergeordnetem Maße in Betracht.“

Es kann heute keinem Zweifel mehr unterliegen, daß wir in den Phosphatiden und Cerebrosiden die Muttersubstanzen der Vitamine zu suchen haben, eine Anschauung, die durch Auffindung des fettlöslichen Faktors bestärkt wird. Wenn sich die bisher durch Extraktion des getrockneten Materials aus verschiedenen Pflanzenteilen mit organischen Lösungsmitteln gewonnenen Phosphatide und deren Spaltungsprodukte als unwirksam für die Heilung der Avitaminosen erwiesen haben, so kann daran das bisherige wenig schonende Verfahren der Isolierung, andererseits das Unvermögen schuld sein, gerade die richtigen Spaltungsprodukte zu gewinnen. Solche Versuche sind in meinem Laboratorium gegenwärtig im Zuge. Indessen sei schon jetzt darauf hingewiesen, daß *Hansteen Cranner*[2]) angibt, die beiden obenerwähnten, durch fraktionierte Fällung mit $AlCl_3$ erhältlichen Phosphatide zeigten bei Tauben und Meerschweinchen das eine anti-

[1]) *H. v. Euler* und *Karl Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **133**, 260, 1924.

[2]) *Abderhalden* und *Schaumann*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **172**, 1918; *Abderhalden*, ebendaselbst **178**, 260, 1920.

neuritische, das andere antiskorbutische Wirksamkeit. Es ist auch gelungen, die beiden ineinander überzuführen, so daß die Vermutung gerechtfertigt ist, die verschiedenen Vitamine, die während der Entwicklung der Pflanze entstehen, entstammten reversiblen Zustandsänderungen der Zellphosphatide. Nach dem genannten Forscher scheint die erste Al-Fällung, das antineuritische Vitamin, eine primäre Phosphatidsubstanz zu repräsentieren, die bei der Keimung des Samens, sowohl unlösliche als lösliche Phosphatide, darunter auch das Antiskorbutikum, bis zu einer für das Entwickelungsstadium spezifischen Gleichgewichtslage abgibt.

Damit erscheint die physiologische Bedeutung der Phosphatide genügend charakterisiert, um es zu rechtfertigen, daß die chemische Untersuchung der Phosphatide um so energischer in Angriff genommen wird, als es durch die Untersuchungen *Hansteen Cranners* nunmehr möglich ist, einerseits zwischen wasserunlöslichen und wasserlöslichen Phosphatiden zu unterscheiden, andererseits die Möglichkeit gegeben ist, zu Präparaten zu gelangen, die vielleicht als nativ angesprochen werden können.

Die wasserlöslichen Phosphatide aus der Wurzel der Zuckerrübe. I.

Von

V. Grafe und **V. Horvat.**

(Aus dem chemischen Laboratorium der Neuen Wiener Handelsakademie.)

(Eingegangen am 14. April 1925.)

Schon *Thudichum*[1]) hat in seinen bekannten Untersuchungen über die Lipoide des Gehirns nicht nur die große Mannigfaltigkeit der Zoolipoide wahrscheinlich gemacht, sondern unter ihnen auch solche gefunden, welche keinen P, dafür aber Kohlehydratgruppen enthielten, so daß zwischen eigentlichen „Phosphatiden" und P-freien „Cerebrosiden" zu unterscheiden war, welche Unterscheidung dann auch für die pflanzlichen Lipoide eintrat[2]). Tatsächlich wurden dann auch im Pflanzenreich sowohl kohlehydratführende, aber P-freie Cerebroside, als auch echte Phosphatide nachgewiesen[3]).

Daß die Phosphatide sehr labile Stoffe vorstellen, die schon durch Licht, unerheblich erhöhte Temperaturen, verdünnte Säuren und Laugen, „indifferente" organische Lösungsmittel gespalten oder wenigstens insofern verändert werden, daß ihr P : N-Verhältnis sich ändert, haben viele Autoren wahrgenommen[4]). Wenn trotzdem meistens Samenmaterial zur Darstellung der Phosphatide verwendet worden ist, so war einerseits die Haltbarkeit, Trockene, andererseits der Reichtum an den gesuchten Verbindungen für diese Wahl maßgebend. Nur ganz gelegentlich suchte man auch in anderen Pflanzenteilen nach Phosphatiden, beschränkte sich aber in der Regel auf die

---

[1]) *I. L. W. Thudichum*, Chemische Konstitution des Gehirns. Tübingen 1901; s. ferner *O. Rosenheim*, Biochem. Journ. **4**, 331, 1909.

[2]) *W. Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 181, 1902; *E. Schulze*, Chem.-Ztg. **32**, 981, 1908.

[3]) *Bamberger* und *Landsiedl*, Monatsh. f. Chem. **26**, 1109, 1905; *I. Zellner*, ebendaselbst **32**, 133, 1057, 1911; *G. Trier*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**, 413, 1913.

[4]) *E. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 500, 1909; *Erlandsen*, ebendaselbst **51**, 71, 1907.

Konstatierung ihres Vorhandenseins oder ihrer aus dem P-Gehalt errechneten Menge. Ein Phosphatid aus der Zuckerrübe erwähnt eine ältere Arbeit von *Lippmann*, ein Phosphatid aus der Althaeawurzel nennt *Friedrichs*, ein solches aus der Wurzel von Daucus Carota beschreibt *Euler* und stellt das Verhältnis N : P fest, auch in anderen Wurzeln und Laubblättern wurden Phosphatide oder deren Spaltungsprodukte beschrieben, ohne daß man aber auf deren Reindarstellung eingegangen wäre[1]).

Seitdem aber *Hansteen-Cranner*[2]) nicht nur die Ubiquität der Phosphatide nachweisen konnte, sondern auch zeigte, daß von lebenden Pflanzenorganen bei Temperaturen unter 20° fortdauernd größere Mengen wasserlöslicher Phosphatide an destilliertes Wasser abgegeben werden, während bei höheren aber noch immer innerhalb der Lebensgrenzen gelegenen auch wasserunlösliche Phosphatide unter Trübung der Flüssigkeit in diese übergehen, war die Möglichkeit zur Trennung beider Gruppen und zu einer Reindarstellung gegeben, welche die bisherigen Arbeiten vermissen ließen. Man kann bei Versuchen mit roter Rübe genau die Gefährdung des Lebens bei Temperaturerhöhung verfolgen, da in dem Moment, wo dies der Fall ist, auch der rote Farbstoff, für den normalerweise die intakten Zellen inpermeabel sind, auszutreten beginnt. Dieser Zustand ist aber reversibel, wenn die Temperaturerhöhung nicht zu lange gedauert hatte, denn bei Übertragung der Schnitte in kaltes Wasser bleibt dasselbe alsbald wieder klar und farblos.

Wir haben in unseren Versuchen mit Schnitten aus der Wurzel der Zuckerrübe [Beta vulgaris[3])] stets mit Wasser von etwa 10° gearbeitet und so aus der durchaus wasserklaren Flüssigkeit nur die wasserlöslichen Phosphatide gewonnen, während das Studium der wasserunlöslichen Anteile einer späteren Arbeit vorbehalten sein möge[4]).

Es konnte zunächst die Angabe *Hansteen-Cranners* (l. c.) bestätigt werden, nach welcher die Salzionen insofern einen Einfluß auf das

---

[1]) *E. O. v. Lippmann*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **20**, 3201, 1887; *Friedrichs*, Arch. f. Pharm. **257**, 288, 1919; *H. v. Euler* und *E. Nordenson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 233, 1908; *H. v. Euler* und *Allan Bernton*, Arkiv för Kemi-etz. 8, 18, nach Chem. Centralbl. **1922, III, 443.**

[2]) *B. Hansteen Cranner*, Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landbrukshöiskole 2, H. 1/2, 1922.

[3]) Für die Beschaffung der notwendigen größeren Mengen Zuckerrüben sind wir Herrn Prof. Dr. *B. Ganzel* zu bestem Danke verpflichtet.

[4]) Durch weitere Untersuchungen ist es wahrscheinlich geworden, daß die „unlöslichen Phosphatide" wenigstens in manchen Fällen einem kolloiden Gleichgewichtszustand entsprechen und aus den „löslichen" hervorgehen, ohne daß zwischen beiden rein chemische Differenzen bestünden.

Herausdringen der wasserunlöslichen Phosphatide aus der Zelle haben, als beim Einlegen der Schnitte in n oder n/2 Lösungen von Alkali- und Mg-Salzen die Flüssigkeit auch bei niederen Temperaturen getrübt wurde, während umgekehrt in ebensolchen Lösungen von Erdalkalisalzen auch bei höheren Temperaturen, bei denen sonst ein Austreten der wasserunlöslichen Phosphatide erfolgte, die Flüssigkeit klar blieb. Beim Übertragen der Schnitte aus den in Alkalisalzen trübe gewordenen Lösungen in solche von Erdalkalien hörte das Herausströmen wasserunlöslicher Phosphatide auf. Auch Leuchtgas oder CO_2 befördert, offenbar infolge Schädigung der Lebensfähigkeit, das Austreten der wasserunlöslichen Anteile. Während aber die Fällung der Phosphatide innerhalb der Zelle durch K-Ionen in sehr geringem Maße, die durch Ca-Ionen schon in beträchtlich verstärktem Maße, aber immerhin noch reversibel stattfindet, ist die durch Bleisalze hervorgerufene irreversibel.

Vor allem wäre die Frage zu beantworten, ob alle so gewonnenen Phosphatide dem Lecithintypus angehören und dabei doch eine größere Komplikation der Zusammensetzung zeigen, oder ob sie Lecithine schlechtweg darstellen. Denn bei den bisher geübten Darstellungsmethoden mit immerhin eingreifenden chemischen Mitteln ist die Gefahr der Abspaltung einzelner Komponenten aus einem großen und labilen Molekül nicht auszuschließen. Infolgedessen haftet der ganzen Phosphatidforschung eine gewisse Unsicherheit dadurch an, daß immer eine Verunreinigung der gewonnenen Präparate mit deren Spaltungsprodukten einerseits möglich ist, andererseits durch Einschließen von nicht lecithinartigen Lipoiden, wie *G. Trier* mit Recht hervorhebt. Ein solches komplizierteres Phosphatid vom Lecithintypus scheint nun in der Tat in unseren Versuchen aus der Wurzel von Beta vulg. gewonnen worden zu sein.

Die große Labilität des Phosphatidmoleküls und seine Unkristallisierbarkeit bedingt, daß es bisher weder direkt, noch auf dem Umwege über Metallverbindungen möglich war, zu analysenreinen Produkten zu gelangen. Die übliche Fällung mit Schwermetallsalzen ergibt wohl eine gewisse Stabilität der hierher gehörigen Verbindungen und dadurch die Möglichkeit der Isolierung in dieser Form, mag es sich nun um chemische oder physikalische Niederschlagsreaktionen[1]) handeln, jedoch hat sich bisher die Freisetzung des Phosphatids aus einer solchen Verbindung deshalb als unmöglich erwiesen, da schon die zur Fällung der Metalle dienenden Reagenzien eine tiefgehende Veränderung oder gar Spaltung des Phosphatids zur Folge hatten. So versuchte[2]) *Erlandsen*

[1]) *W. Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 181, 1902/03.
[2]) *A. Erlandsen*, ebendaselbst **51**, 141, 1907.

eine Ausfällung des Phosphatids aus dem Myokardium über die Cd-Verbindung, jedoch mißlang der Versuch der Freisetzung des Phosphatids, indem schon der zur Entfernung des Cd verwendete H_2S eine „Dekomposition" des Phosphatids bewirkte. Dieselbe Erfahrung machten auch wir, als wir die Entfernung des Schwermetalls aus der Bleifällung unseres Phosphatids mittels H_2S versuchten. Immerhin scheint uns die in unseren Versuchen erhaltene Bleifällung, welche infolge der äußerst schonenden Darstellungsweise eine Veränderung nahezu ausschloß, so rein als irgend möglich zu sein, was ihre Verwendung zur quantitativen Analyse berechtigt erscheinen ließ. Tatsächlich ergaben die Analysenwerte eine so befriedigende Konstanz, wie sie nur von analysenreinen Substanzen geliefert werden. Ja, sie ließen sogar die Möglichkeit nicht ausgeschlossen erscheinen, zu einem Strukturbild des Phosphatids zu gelangen, denn sie paßten befriedigend zu den für eine wahrscheinliche Formel berechneten Zahlenwerten.

Mit einem Phosphatid, für welches die Kriterien der Reinheit und Unzersetztheit viel weniger gegeben waren als für das unsere, hat *Euler*[1]) gearbeitet und elementaranalytische Werte publiziert; wohl hat er im CO_2-Strom gearbeitet, aber dabei Alkohol, Äther, Chloroform, Ligroin und Pyridin unter Anwendung höherer Temperaturen benutzt und so aus Karotten ein Phosphatid extrahiert, das schließlich ein dunkelbraunes, bei 40° erweichendes Öl darstellte, welches bei der Mikroanalyse 61,2 Proz. C, 9,8 Proz. H, 2,2 Proz. N, ferner 3,30 bis 3,55 Proz. P lieferte. Daraus schließt *Euler*, daß er kein reines Produkt, sondern ein durch ein Diaminophosphatid verunreinigtes Monoaminophosphatid unter den Händen gehabt hatte.

Experimenteller Teil.

Zur möglichsten Reindarstellung der wasserlöslichen Phosphatide wurden zunächst Vorversuche betreffend die Zurückhaltung derselben beim Einlegen der Schnitte in die Lösungen von Erdalkalisalzen, Behandlung mit CO_2 und Leuchtgas angestellt. Dabei wurde nicht nur die durch Klarbleiben des Dialysats gewährleistete Zurückhaltung der wasserunlöslichen Phosphatide in der Zelle verfolgt, sondern auch die Permeabilitätsverhältnisse an dem Mitaustreten eines Kristalloids studiert, als welches sich bei der Zuckerrübe naturgemäß als bequemstes der Rohrzucker ergab. Alle Flüssigkeiten, die sich aus den Versuchen ergeben hatten, wurden stets auf das Vorhandensein und die Menge der mitausgetretenen wasserlöslichen Phosphatide geprüft. Es zeigte sich dabei einerseits, daß schon in die Salzlösung größere Mengen der gewünschten Phosphatide übergegangen waren, andererseits, daß die Dialysate dadurch stets unbequeme Mengen von Mineralstoffen übernahmen, welche unter Umständen die spätere Analyse der organischen Körper zu erschweren geeignet gewesen wären. Da sich schließlich zeigte, daß das Einlegen in Salzlösungen auch durch längeres Stehen der Schnitte in Wasser ersetzt werden konnte, wurde

[1]) *H. v. Euler* und *Allan Bernton*, l. c.

später von dieser Methode Abstand genommen. 2 bis 3 mm dicke Schnitte der Zuckerrübe wurden in die nachbezeichneten Salzlösungen in großen Steingutschalen, wie sie in photographischen Laboratorien verwendet werden, so eingelegt, daß die Schnitte, in einer Schicht liegend, von der Flüssigkeit einen Finger hoch bedeckt waren. Nach sechsstündigem Verweilen darin wurden sie mit Leitungswasser rasch abgespült und bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur gegen destilliertes Wasser dialysiert. Es wurde dann nach 24 Stunden der in die Salzlösung und der in das Dialysewasser durch die angegebene Zeit übergetretene Zucker nach der maßanalytischen Methode von *Fehling-Soxhlet* bestimmt. Ob gleichzeitig in die Salzlösung oder in das Wasser unlösliche Phosphatide übergetreten waren (Trübung der Flüssigkeit) oder nicht (Klarbleiben der Flüssigkeit), erscheint in der folgenden Tabelle durch ein „+" bzw. durch ein „—" ausgedrückt.

1	n $CaCl_2$	n/2 $CaCl_2$	n/4 $CaCl_2$	n/8 $CaCl_2$	n/10 $CaCl_2$	$Ca(OH)_2$ ges. Lsg.	n/100 $CaCl_2$ + $Ca(OH)_2$ ges. Lsg.	n/4 $Ca(NO_3)_2$
2	1,052	3,38	1,88	3,18	3,004	10,5	9,02	5,64
3	—	—	—	—	—	+	+	—
4	13,91	15,79	13,579	15,16	12,032	7,9	6,72	16,92
5	—	—	—	—	—	+	+	+

1	n/8 $Ca(NO_3)_2$	n/2 KCl + n/2 $CaCl_2$	n/4 KCl + n/4 $CaCl_2$	n/8 KCl + n/8 $CaCl_2$	n/4 KCl	n/4 KCl + n $CaCl_2$	n/4 KCl + n/2 $CaCl_2$	n/2 KCl + n/4 $CaCl_2$
2	5,64	4,51	2,26	2,26	2,26	2,25	1,4	2,35
3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	15,79	14,66	15,79	15,79	15,79	15,79	16,82	15,91
5	+	+	+	+	+	—	—	+

1	n/2 KCl + n/8 $CaCl_2$	n/2 KCl	n/2 KCl + n $CaCl_2$	n/2 KCl + n/4 $CaCl_2$	CO_2	Leuchtgas	CO_2 dosiert	Leuchtgas dosiert
2	2,82	3,38	2,26	2,26	17,12	18,2	6,77	8,95
3	—	—	—	—	+	+	+	+
4	15,79	14,55	15,79	14,55	1,64	2,62	8,46	0
5	+	+	—	+	+	+	+	+

1 = Lösungen, in welche die Schnitte eingelegt wurden, bevor sie der Dialyse unterworfen worden waren.
2 = Prozente Zucker, die bei sechsstündigem Verweilen der Schnitte in obigen Lösungen in diese austreten (bzw. aus Lebendgewicht der Rübe).
3 = Bezeichnung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins wasserunlöslicher Phosphatide in den obigen Lösungen.
4 = Prozente Zucker, der bei der nachfolgenden Dialyse bei 60° durch 4 Std. gegen dest. Wasser in diese übergetreten ist (bzw. aus Lebendgewicht der Rübe).
5 = Vorhanden- oder Nichtvorhandensein wasserunlöslicher Phosphatide im Dialysat.
Dosiert-Einleiten des Gases durch 6 Std., d. h. so lange, als sonst die Schnitte in den Salzlösungen gelegen hatten. Sonst Einleiten durch die ganze Zeit.

Darstellung des wasserlöslichen Phosphatidanteils.

2 bis 3 mm dicke Schnitte gesunder, frisch geschälter Rüben (Beta vulgaris) wurden so in flache Glas- oder Steingutschalen eingelegt, daß sie eine einzige dichte Schicht bildeten, und sofort mit destilliertem

Wasser übergossen, so daß sie eben bedeckt erschienen. So wurden sie bei genau 18° je 24 Stunden von Glasplatten locker bedeckt stehengelassen. Die ganz klare wasserhelle oder höchstens ganz leicht gelbliche Flüssigkeit gab keine Reaktion auf Proteine (die *Millon*sche und Biuretreaktion fielen negativ aus, ebenso die Xanthoproteinreaktion und die Farbenreaktion nach *Molisch* und *Adamkiewicz*). Bei Abschluß des Versuchs waren die Scheiben noch frisch, weiß und turgeszent, an frisches Wasser gaben sie, wie durch die versuchte Fällung mit Bleiacetat festzustellen war, keinerlei Phosphatide mehr ab. Nach der genannten Zeit wurden überhaupt keine wasserlöslichen Phosphatide mehr abgegeben.

Das Dialysat wurde rasch bei höchstens 40° eingedampft. In einigen Versuchsreihen stellten sich infolge des hohen Zuckergehalts des Dialysats Ansammlungen von Mikroorganismen ein, welche die Lösung trübten und, abgesehen von deren schweren Filtrierbarkeit, auch noch unkontrollierbare Veränderungen der zu prüfenden Substanzen herbeizuführen geeignet waren. Der Versuch, solche Pilzinfektionen durch verschiedenartige Antiseptika, wie $CHCl_3$, Äther, Sublimat, zu verhindern, schlugen fehl, weil die Konzentrationen der genannten Substanzen, in denen man sie hätte verwenden müssen, um dahingehende Erfolge zu erzielen, so groß gewesen wären, daß dadurch die Gewinnung von nativen Phosphatiden in Frage gestellt worden wäre. Daher blieb nichts anderes übrig, als die für die Dialyse verwendeten Schalen durch Abbrennen zu sterilisieren und den Verdampfungsprozeß trotz der gebotenen niedrigen Temperatur möglichst zu beschleunigen. Das geschah zuerst durch Abdestillieren des Wassers bei einer Luftverdünnung von 10 bis 15 mm der Wasserstrahlpumpe, später nach einem Verfahren, das jenem nachgebildetet war, das *E. St. Faust*[1]) angibt. Das Dialysat befand sich in einer großen flachen Schale am Wasserbad; durch einen großen elektrischen Ventilator wurde ein Luftstrom erzeugt, der elektrisch erwärmt und auf die Oberfläche der Flüssigkeit geblasen wurde. Dadurch wurden bei einer Oberfläche von 280 qcm bei einer Temperatur von höchstens 28° innerhalb von 3 Stunden 4 Liter Wasser verdampft.

Die Konzentrierung wurde in der Regel so weit getrieben, daß die Flüssigkeit mit Bleiacetatlösung einen sich schnell absetzenden, grobflockigen Niederschlag ergab. Zu der so weit eingedampften Flüssigkeit wurde nunmehr tropfenweise unter Umrühren n-Bleiacetatlösung (379 g $Pb(C_2H_3O_2)_2 + 3 H_2O$ *Merck* p. a. im Liter Wasser) zugesetzt, die mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure in Lösung gebracht worden war. Das Ergebnis war zunächst eine weiße Trübung, die

[1]) *E. St. Faust*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 1, 162.

alsbald in einen dichten, grobflockigen Niederschlag überging, welcher sich innerhalb ganz kurzer Zeit vollkommen absetzte und sich in der Kälte leicht durch gewöhnliches Filtrierpapier filtrieren ließ, während er, wie wiederholte Vorversuche ergeben hatten, in der Wärme schleimig ausfiel und sich dann nicht mehr filtrieren ließ. War zu wenig Bleiacetat zugesetzt worden, so fiel im Filtrat der Fällung mit weiterem Bleiacetat noch Niederschlag aus, der sich dann besonders leicht und vollständig absetzte, wenn dem Filtrat vor der Fällung einige Tropfen Ammoniak zugesetzt worden waren. Die ursprüngliche Vermutung, daß durch solche fraktionierte Fällung chemisch verschiedenartige Phosphatid-Präparate erhalten werden könnten, bestätigte sich nicht, die Niederschläge unterschieden sich vielmehr weder im Aussehen noch ergaben sie verschiedene Analysenwerte.

Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die obenstehende Flüssigkeit abdekantiert, der Niederschlag abgesaugt und mit Wasser bis zum Verschwinden der Bleireaktion nachgewaschen, dann im Vakuumexsikkator getrocknet. Er zeigte rein weiße Farbe und ließ sich in der Achatreibschale pulvern. Das Pulver wurde zur Entfernung von noch anhaftendem Zucker mit der hundertfachen Menge Wassers mehrere Stunden in der Kälte digeriert, abgesaugt und wieder im Vakuum getrocknet. Das Filtrat zeigte nach der Hydrolyse mit HCl eine ganz schwache Reduktion der *Fehling*schen Lösung. Das so gereinigte, in der weiteren Folge „A-Phosphatid" genannt, wurde zur weiteren Charakterisierung der Spaltung und die Spaltungsprodukte der analytischen Bestimmung unterworfen. Da die Methoden, die zu seiner Gewinnung in Anwendung gekommen waren, im Gegensatz zu jenen anderer Autoren die äußerste Schonung der molekularen Zusammensetzung des Phosphatids gewährleisten, da weder höhere Temperaturen noch eingreifende chemische Operationen, ja sogar die Anwendung direkten Lichtes vermieden worden war, erschien die Ansicht gerechtfertigt, daß es sich um ein unverändertes, von Spaltungsprodukten freies Phosphatid in der Bleiverbindung handelte; es wurde auch, wie später beschrieben, versucht, das Dialysat durch Anwendung verschiedener Bleiacetatmengen und -konzentrationen einer fraktionierten Fällung zu unterziehen; da aber auch hierbei unter den verschiedensten Versuchsbedingungen stets ein und dasselbe Phosphatid resultierte, da nicht nur die Relation N : P, sondern auch deren Prozentgehalt und die Art der Spaltungsprodukte konstant blieben, so konnte wohl daraus geschlossen werden, daß es sich um ein reines, einheitlich zusammengesetztes Produkt handelte. Daher wurde kein Anstand genommen, dasselbe der Elementaranalyse und anderen quantitativen Bestimmungen zu unterziehen, obwohl die Substanz des wichtigsten Kriteriums für Reinheit, der Kristallisation, entbehrte, wie es bei einem

so hochmolekularen Produkt auch nicht anders erwartet werden konnte. Es wurde wiederholt versucht, aus der Bleiverbindung das bleifreie Phosphatid zu erhalten, ohne daß diese Versuche zu dem gewünschten Resultat geführt hätten, denn die Fällung des Pb mit H_2SO_4 schloß gleichzeitig eine Spaltung des Phosphatids in sich, die Fällung mit H_2S dagegen lieferte eine schmutzigbraune, ölige Substanz, die mit Bleiacetat keine Fällung mehr gab, die der früheren beim A-Phosphatid stets eintretenden Bleifällung entsprochen hätte und bei analytischen Versuchen kein einheitliches Resultat mehr ergab.

1. *P-Bestimmung*: Die Substanz wurde mit einem Gemenge von Soda-Salpeter im Platintiegel verascht, die Asche mit HNO_3 aufgenommen und in der Lösung der P durch doppelte Fällung als Molybdat und nach dessen Auflösung als Magnesiumphosphat gefällt und nach dem Glühen als $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

Mittel aus drei Bestimmungen: 0,2514 g Substanz ergaben 0,025 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend **2,78 Proz. P.**

2. *N-Bestimmung*: Die Bestimmung wurde nach der Methode von *Kjeldahl* mit $CuSO_4$ als Katalysator durchgeführt und zur Kontrolle der H_2SO_4 und des $CuSO_4$ ein blinder Parallelversuch ausgeführt.

Für (Mittel aus drei Bestimmungen) 0,3949 g Substanz wurden verwendet 83 ccm n/10 H_2SO_4, entsprechend **0,624 Proz. N.**

3. *Pb-Bestimmung*: In der wie früher hergestellten Asche wurde das Pb als Sulfat bestimmt.

(Mittel aus zwei Bestimmungen) 0,5925 g Substanz ergaben 0,3117 g $PbSO_4$, entsprechend **36,1 Proz. Pb.**

4. *Elementaranalyse*: 0,458 g Substanz lieferten 0,6956 g CO_2 und 0,5556 g H_2O, entsprechend **41,45 Proz. C** und **6,78 Proz. H.**

Demnach hatte die Analyse des Bleiphosphatids A als Werte ergeben: 41,45 Proz. C, 6,78 Proz. H, 2,78 Proz. P, 0,624 Proz. N, 36,10 Proz. Pb.

Abbau des A-Phosphatids.

Alle bisherigen Analysen von Phosphatiden des Pflanzen- und Tierorganismus wurden durch Hydrolyse mittels H_2SO_4 verschiedener Konzentrationen durchgeführt. Dabei werden die im Phosphatid eventuell gebundenen Kohlehydratgruppen unverändert abgespalten, was bei einer Hydrolyse durch Basen als spaltendes Agens nicht der Fall wäre[1]). Die Spaltung wurde daher auch hier mit H_2SO_4 von 5, 10 und 20 Proz. vorgenommen.

[1]) *O. Hiestand*, Dissertation Zürich; *E. Winterstein* und *O. Hiestand*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 288, 1908; *F. Malengreau* und *G. Prigent*, ebendaselbst **77**, 107, 1912; **73**, 68, 1911; *E. Winterstein* und *Smolenski*, ebendaselbst **58**, 506, 1909; *Willstätter* und *Lüdecke*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **37**, 3753, 1904; *E. Abderhalden*, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 6, Heft 1, S. 135.

Spaltung mit 5 proz. H_2SO_4.

50 g Bleiacetatphosphatid wurden mit 500 cm³ der H_2SO_4 am Rückfluß 6 Stunden über freier Flamme erhitzt, die Flüssigkeit färbte sich unter Trübung ganz dunkel. Nach dem Erkalten wurde das Ungelöste abfiltriert, nachgewaschen und die vereinigten sauren Filtrate so lange mit Äther durchgeschüttelt, bis die ätherische Schicht farblos blieb. Die Trennung von wässeriger und ätherischer Schicht gestaltete sich schwierig, da die sich bildenden zähen Emulsionen durch Aussalzen nicht beseitigt werden konnten. Das gelang vielmehr erst durch längeres Stehen bei mäßiger Wärme. Nach Vertreiben des Äthers hinterblieb eine ölige, braune, in heißem Alkohol leicht lösliche Flüssigkeit. Die alkoholische Lösung wurde mit Baryt in großem Überschuß 2 Stunden am Wasserbad digeriert, der überschüssige Baryt abfiltriert und das alkoholische Filtrat langsam eingedampft. Der bräunliche, mikrokristallinische Rückstand wurde abgesaugt, mit Wasser gut gewaschen, wieder in Ätheralkohol gelöst und im Vakuum eingedunstet. Das sich ausscheidende Kristallpulver wurde nach nochmaligem Umkristallisieren analysiert. Die gewogene Substanz wurde wie früher verascht und das Ba in der gewöhnlichen Weise bestimmt.

Mittel aus zwei Bestimmungen: 0,5925 g Substanz ergaben 0,1894 g $BaSO_4$, entsprechend **19,65 Proz. Ba,** berechnet für Ba-Oleat 19,63 Proz. Ba.

Schon vor dieser Spaltung war als Vorprobe ein kleinerer Versuch zur Charakterisierung dieses Spaltungsproduktes vorgenommen worden, wobei durch positiven Ausfall der Elaidinprobe das Vorhandensein von Ölsäure wahrscheinlich wurde. Dieser Befund wurde dann noch durch Anstellung der Jodzahlbestimmung befestigt, die 89,3 ergab, gegenüber 90,07 für Ölsäure.

Die vom ätherischen Extrakt abgetrennte wässerige Schicht wurde nach völligem Verjagen des Äthers mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung in großem Überschuß versetzt und der entstehende weiße Niederschlag nach dem Absaugen mit 5 Proz. H_2SO_4 gewaschen. Dann wurde der Niederschlag, welcher die durch die Phosphorwolframsäure gefällte Base enthielt, in wenig Wasser aufgeschlämmt und 3 Stunden mit festem Baryt digeriert. Nun war die Base in Lösung gegangen, wurde vom Ba-Phosphorwolframat abfiltriert und im Filtrat durch Einleiten von CO_2 der Baryt ausgefällt. Nach Abfiltrieren des $BaCO_3$ wurde das klare, fast farblose Filtrat mit starker HCl versetzt und langsam am Wasserbad eingedampft. Der kristallinische Rückstand war in Alkohol löslich. Einige Tropfen dieser alkoholischen Lösung lieferten mit gesättigter Alloxanlösung rotviolette, nach Versetzen mit NaOH blauviolette Farbenreaktion (Alloxanprobe auf Cholin), mit gesättigter Sublimatlösung einen schönen weißen kristallinischen Nieder-

schlag (Reaktion auf Cholin, Betain, Trigonellin). Die kleinen weißen, nach Abdunsten des Alkohols hinterbleibenden, sehr zerfließlichen Nadeln gaben mit $PtCl_4$ die typischen Kristalle des Cholinchloroplatinats, nämlich nebeneinander auftretende Prismen, Nadeln und doppelbrechende sechsseitige Tafeln. Nach dem Umkristallisieren aus wässerigem Alkohol aber erschienen nur Oktaeder und Würfel. Das getrocknete Präparat wurde nach *Wallach*[1]) mit alkoholischer Na-Lösung zerstört und lieferte bei der Analyse:

3562 g Substanz ergaben 0,1133 g Pt, entsprechend 31,8 Proz. Pt, und 0,4955 g AgCl, entsprechend 34,41 Proz. Cl.

Berechnet für das Pt-Doppelsalz des Cholins $(C_5H_{14}ONCl)_2PtCl_4$: 31,67 Proz. Pt und 34,53 Proz. Cl.

Damit ist die Identität dieses Spaltungsprodukts mit Cholin erwiesen.

Das Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung des Cholins, welches noch die Glycerinphosphorsäure enthalten mußte, wurde zur Befreiung von der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit einem großen Überschuß von Baryt versetzt und mehrere Stunden damit digeriert. Von den ausgeschiedenen Salzen der Phosphorwolfram- und Phosphorsäure wurde abfiltriert, das Filtrat durch CO_2 vom gelösten Baryt befreit, das $BaCO_3$ abfiltriert. Nunmehr war offenbar das Glycerin, an Phosphorsäure gebunden, in Form des Ba-Glycerophosphats vorhanden, denn die Flüssigkeit gab, mit H_2SO_4 behandelt, starken weißen Niederschlag, starke Reaktion auf Phosphorsäure und beim Erhitzen mit $KHSO_4$ den charakteristischen Acroleingeruch. Nach *Willstätter* und *Lüdecke* (l. c.) ist das Ba-Salz der natürlichen Glycerinphosphorsäure in kaltem Wasser außerordentlich leicht löslich, schwerer in siedendem, es setzt sich beim Erhitzen der Lösung als Haut an der Gefäßwand ab, wird dadurch schwerer filtrierbar, da es außerdem bei geringer Temperaturerniedrigung wieder in Lösung geht. Durch Alkohol, in dem es unlöslich ist, wird es aus verdünnter Lösung als schleimiger Niederschlag gefällt, aus konzentrierter in kompakten Flocken. Mit diesen Angaben der Literatur stimmen nun unsere Beobachtungen völlig überein. Das mit Baryt gereinigte Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung wurde am Wasserbad bis zur Ausscheidung der Kristallhaut eingeengt und dann bei 30° mit einem warmen Luftstrom möglichst weit eingedampft. Beim Erwärmen schieden sich schließlich Kristallblättchen in größerer Menge aus, die im Heißwassertrichter von der Mutterlauge getrennt wurden. Das in wenig Wasser gelöste, mit Tierkohle gereinigte Präparat wurde mit Alkohol ausgefällt und zeigte im Halbschattenpolarimeter im 100-cm-

[1]) *Wallach*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **14**, 753, 1881.

Rohr eine minimale, aber deutlich bemerkbare *Links*drehung. Die gereinigte und getrocknete Substanz wurde mit Sodasalpeter verascht und darin P und Ba in der üblichen Weise bestimmt.

0,5328 g Substanz ergaben 0,3893 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend **10,18 Proz. P.**
0,3562 g Substanz ergaben 0,2694 g $BaSO_4$, entsprechend **44,51 Proz. Ba.**
Berechnet für wasserfreies Ba-Glycerophosphat $C_3H_7PO_6Ba$: P = 10,09 Proz., Ba = 44,67 Proz.

Der Rückstand nach der Spaltung des Phosphatids mit H_2SO_4, welcher das Pb der Pb-Phosphatidverbindung als $PbSO_4$ enthielt, wurde zur Entfernung des anhaftenden organischen Körpers mehrmals mit kochendem Alkohol extrahiert, worauf er schließlich vollkommen weiß erschien. Die vereinigten alkoholischen Extrakte wurden stark mit Wasser verdünnt, wobei ein brauner voluminöser Niederschlag entstand, der Alkohol am Wasserbad verjagt und die wässerige Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Der Niederschlag hatte sich dabei fast völlig im Äther gelöst und hinterblieb nach Abdunsten des Äthers als fester hellbrauner Rückstand. In siedendem Alkohol aufgelöst und mit starker HCl gefällt, ergab er einen weißen Niederschlag, der nach wiederholtem Umkristallisieren schließlich in schuppigen Kristallen ausgebildet erschien. Schmelzpunkt derselben 62 bis 63° (Schmelzpunkt der Palmitinsäure 62,62°). 0,3852 g Substanz verbrauchten 15,05 ccm n/10 KOH, entsprechend 0,08448 g KOH, woraus die Säurezahl sich mit **219,3** errechnet (berechnet für Palmitinsäure 218,9).

Der größere Teil des Rückstandes wurde in siedendem Alkohol gelöst, mit alkoholischer $AgNO_3$-Lösung versetzt und langsam auskristallisieren gelassen. Es bildete sich das Ag-Salz in kleinen glänzenden Kristallblättchen, die abgesaugt und nach zweimaligem Umkristallisieren zur Bestimmung des Ag verwendet wurden.

0,2345 g Substanz ergaben 0,0698 g Ag, entsprechend **29,7 Proz. Ag**, berechnet für das Ag-Salz der Palmitinsäure ($C_{16}H_{31}O_2Ag$) : 29,62 Proz. Ag.

Die Spaltung mit 10proz. H_2SO_4 ergab dieselben Spaltungsprodukte wie die oben beschriebenen mit 5proz. Säure.

Spaltung mit 20proz. H_2SO_4.

20,1900 g Substanz wurden durch 8 Stunden mit 20proz. H_2SO_4 (200 ccm) am Rückfluß erhitzt. Die dunkel gefärbte Flüssigkeit wurde von dem ausgefallenen festen Körper abfiltriert und das Filtrat andauernd mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abtreiben des Äthers hinterblieb ein kristallisierter Rückstand und eine kleine Menge einer öligen Flüssigkeit. Die beiden wurden durch Zentrifugieren voneinander getrennt und der Rückstand wiederholt zuerst aus Wasser und dann aus Alkohol umkristallisiert. Die entstehenden Blättchen schmolzen

bei 97° und verflüchtigten sich bei 200°. Sie sind in Äther, Alkohol, Wasser leicht löslich, geben mit $CaCl_2$ einen schweren weißen Niederschlag und ergaben bei der Mikroanalyse folgende Werte:

(Mittel aus zwei Bestimmungen) 3,705 mg Substanz ergeben 3,97 mg H_2O, entsprechend **6,0 Proz. H,** und 6,18 mg CO_2, entsprechend **45,5 Proz. C.**
Berechnet für Glutarsäure: 45,43 Proz. C und 6,12 Proz. H.

Ein anderer Teil der kristallisierten Säure wurde in wässeriger Lösung mit $AgNO_3$ versetzt und die Flüssigkeit am Wasserbad eingeengt, wobei das Ag-Salz auskristallisierte. Nach dem Umkristallisieren und Trocknen im Vakuum ergab es für 0,1834 g Substanz 0,1519 g AgCl, entsprechend 62,25 Proz. Ag, berechnet für das Ag-Salz der Glutarsäure ($C_5H_6O_4Ag_2$) 62,49. Damit erscheint das in Äther lösliche Spaltungsprodukt als Glutarsäure charakterisiert, die auch nach *Carette*[1]) als Spaltungsprodukt der Ölsäure auftritt. Die sehr geringe Menge der abzentrifugierten Flüssigkeit, die schon nach der Stelle des Analysenganges, wo sie auftritt, als jene Menge der Ölsäure betrachtet werden konnte, die dem Abbau entgangen war, wurde lediglich der qualitativen Prüfung unterzogen. Etwas reine Watte in konzentrierter H_2SO_4 gelöst, wird mit einigen Tropfen der öligen Flüssigkeit versetzt und unter Schütteln mit Wasser stehengelassen. Es trat zuerst Rot- und nach einiger Zeit Violettfärbung ein, eine Reaktion, die nach *Manea*[2]) auch dann eintritt, wenn die Ölsäure verunreinigt ist und wenn gesättigte Fettsäuren zugegen sind. Die nach dem oben beschriebenen Ausschütteln mit Äther hinterbliebene Flüssigkeit wurde in der vorigen Weise durch Fällung mit Phosphorwolframsäure von der Base befreit und im Rückstand die Au-Fällung derselben vorgenommen. Ferner ergab die Perjodidprobe die für Cholin charakteristischen Kristalle, nämlich braunschwarze, stäbchenförmige, an Größe zunehmende und dann bald verflüssigende Nadeln.

Bisher hatten sich niemals Anhaltspunkte dafür ergeben, daß in unserem Phosphatid Kohlehydratgruppen enthalten seien, wie sie viele andere Autoren in ihren Präparaten gefunden hatten. Eine Abspaltung solcher Gruppen hätte, wenn nicht schon bei Spaltung mit den verdünnteren Säuren, so doch mindestens mit der 20proz. H_2SO_4 erfolgen müssen. Der Zucker hätte sich dann nach Abspaltung des Basenanteils des Phosphatids im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung des Cholins vorfinden müssen. Das eingeengte Filtrat gab allerdings weder in der Kälte noch nach dem Kochen mit *Fehling*scher Lösung eine Fällung. Trotzdem wurde noch versucht, durch Aus-

---

[1]) *Carette*, Bull. de la Soc. chim. **45**, 270, 1886; nach Abderhaldens biochem. Handlexikon **1**, 1136, 1911.

[2]) *Manea*, Chem. Centralbl. **1908**, II, 1703.

fällen durch Baryt den Zucker zu finden, der sich dabei in das Ba-Saccharat hätte verwandeln müssen. Die Probe fiel absolut negativ aus. *Kohlehydratgruppen finden sich also in unserem Phosphatid nicht.*

Zur Identifizierung des Ba-Glycerophosphats wurde die eingedampfte Flüssigkeit desselben Filtrats mit Alkohol versetzt, der entstehende dichte flockige Niederschlag abfiltriert, mehrmals durch Auflösen und Wiederfällen gereinigt, bei 135° getrocknet und zur Ba-Bestimmung verwendet.

0,5273 g Substanz ergaben 0,3989 g $BaSO_4$, entsprechend 44,53 Proz. Ba.
0,4891 g Substanz ergaben 0,3502 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 9,98 Proz. P.
Berechnet für wasserfreies $C_3H_7PO_6Ba$: 44,67 Proz. Ba und 10,09 Proz. P.

Der nach der Spaltung mit H_2SO_4 entstandene Niederschlag, der wiederum neben dem gebildeten $PbSO_4$ noch Palmitinsäure enthielt, wurde mit Alkohol extrahiert, die Fettsäure mit HCl gefällt, in Äther gelöst und wie früher gereinigt. Die Bestimmung der Säurezahl ergab: 0,4115 g Substanz verbrauchten 16,13 ccm n/10 KOH, woraus Säurezahl 219,9 sich berechnet, für Palmitinsäure berechnet 218,9.

Die mit der höher konzentrierten H_2SO_4 erhaltenen Spaltungsprodukte waren also dieselben geblieben wie mit der verdünnten, nur daß jetzt die Ölsäure noch weiter gespalten und bis zur Glutarsäure abgebaut worden war. Die Spaltungsprodukte und wohl die Komponenten unseres Phosphatids waren also: Cholin, Glycerinphosphorsäure, Ölsäure, Palmitinsäure.

Um noch den Nachweis zu führen, daß das vorbeschriebene Phosphatid ein einheitlicher Körper und kein Gemisch verschiedener Phosphatide darstellt, wurde eine fraktionierte Fällung mit verschiedenen Bleiacetatkonzentrationen und -mengen ausgeführt.

4 kg Rübenschnitten, die, wie eingangs beschrieben, in fließendem Wasser gewaschen worden waren, wurden in Schalen 24 Stunden der Dialyse unterworfen, wodurch etwa 5 Liter Dialysat gewonnen wurde. Dasselbe wurde in möglichst kurzer Zeit nach der eingangs beschriebenen Methode bei sehr niedriger Temperatur eingedampft und die erhaltenen 2 Liter in vier Teile zu 500 ccm geteilt.

1. 500 ccm Dialysat wurden mit *10 ccm doppeltnormaler* Bleiacetatlösung tropfenweise gefällt, wobei sich sofort ein flockiger, weißer Niederschlag von gewohntem Aussehen ergab, der sich schnell und leicht absetzte. Nach dem gewöhnlichen Auswaschen und Trocknen wurde der Rückstand, dessen Gewicht nunmehr 1,423 g betrug, zur Bestimmung von P und N herangezogen.

0,4907 g Substanz ergaben nach der Veraschung mit Sodasalpeter und Fällung mit Ammoniummolybdat bzw. weiße Magnesiamixtur und Glühen 0,0496 g $Mg_2P_2O_2$ = **2,72 Proz. P.**

0,4968 g Substanz, mit konzentrierter H_2SO_4 und $CuSO_4$ als Katalysator verbrannt, ergaben bei der Titration einen Verbrauch von 2,01 ccm n/10 H_2SO_4 = **0,57 Proz. N.**

Das Filtrat von dem obigen Niederschlag ergab mit Bleiacetat keine weitere Fällung.

2. 500 ccm Dialysat, mit *10 ccm normaler Bleiacetatlösung* tropfenweise gefällt, ergaben eine Fällung von demselben Aussehen wie die vorige und nach dem Trocknen ein Gewicht von 1,356 g.

0,5512 g Substanz ergaben 0,0559 g $Mg_2P_2O_7$ = **2,80 Proz. P.** 0,6081 g Substanz verbrauchten bei der Kjeldahlbestimmung wie oben 2,68 ccm n/10 H_2SO_4 = **0,61 Proz. N.**

Eine weitere Fällung mit Bleiacetat trat auch hier nicht ein.

3. 500 ccm des Dialysats wurden mit *10 ccm einer halbnormalen* Bleiacetatlösung gefällt. Es ergab sich ein flockiger Niederschlag von gewöhnlichem Aussehen und dem Trockengewicht von 1,283 g.

0,4862 g Substanz ergaben 0,0487 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend **2,79 Proz. P.** 0,7635 g Substanz verbrauchten 3,37 ccm n/10 H_2SO_4 = **0,62 Proz. N.**

Der Niederschlag setzte sich hier nicht so schnell und grobflockig ab wie in den früheren Fällen und bei nochmaligem Zusatz von Bleiacetat trübte sich dasselbe.

4. 500 ccm Dialysat wurden mit *10 ccm einer zehntelnormalen* Bleiacetatlösung gefällt und ergaben einen Niederschlag von obigem Aussehen, der sich jedoch erst nach 24 stündigem Stehen vollkommen abgesetzt hatte. Nach dem Trocknen im Vakuum üblichen Methode 0,0541 g wog er nur 0,5328 g, welche nach der $Mg_2P_2O_7$ ergaben, entsprechend **2,82 Proz. P.** Die Bestimmung des N mußte hier wegen der zu geringen Menge des Niederschlags unterbleiben.

Dasselbe Filtrat von dem obigen Niederschlag ergab noch eine reichliche Fällung mit 50 ccm n/10 Bleiacetatlösung, wobei sich der Niederschlag schon nach 10 Stunden vollkommen absetzte. Nach dem Trocknen wog er 0,7628 g und ergab:

0,2356 g Substanz lieferten 0,0237 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend **2,79 Proz. P.** 0,5272 g Substanz verbrauchten 2,33 ccm n/10 H_2SO_4, entsprechend **0,603 Proz. N.**

Das Filtrat nach diesem Niederschlag lieferte weiter keine Fällung.

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die verschiedenen fraktionierten Fällungen stets ein und dasselbe Phosphatid ergeben, wie aus der

Konstanz der N : P-Relation und den absoluten Mengen der genannten Elemente sich ergibt. Auch das scheint mir ein Kriterium für die Reinheit des erhaltenen Phosphatids zu sein[1]).

Außer einer einzigen Angabe[2]) finden sich in der Literatur meines Wissens nirgends Daten über die elementaranalytische Bestimmung eines Phosphatids. Da unser Präparat bei der Verbrennung hinlänglich verläßliche Zahlen ergeben hatte und überdies die erhaltenen Daten bei der Bestimmung des darin enthaltenen Pb, P und N übereinstimmende Resultate lieferten, konnte mit allem Vorbehalt an die Diskussion der molekularen Zusammensetzung des gewonnenen Phosphatids herangetreten werden.

Die hierfür dienenden, aus den vorbeschriebenen Untersuchungen gewonnenen Daten lauten wie folgt:

C	41,45 Proz.	
H	6,78 „	
P	2,78 „	
N	0,624 „	
Pb.	36,10 „	
O	12,26 „	(aus der Differenz berechnet).

Die gefundenen Spaltungsprodukte sind: Ölsäure, Palmitinsäure, Cholin, Phosphorsäure, Glycerin, Blei.

Nach dem gefundenen Verhältnis ist N : P = 1 : 2 (aus 0,624 : 2,78 = 14 : 62,34 ergibt sich N : P = 1 : 2,01).

Daraus wäre zu schließen, daß im Molekül des Phosphatids mindestens zwei Atome P und ein Atom N enthalten sind, entsprechend 2 Mol. H_3PO_4 und 1 Mol. Cholin. Aus dem gefundenen N-Gehalt würde sich unter der Annahme, daß nur ein Atom N im Molekül des Phosphatids enthalten ist, das Molekulargewicht der Verbindung mit 2243 errechnen. Dieses Molekulargewicht erscheint nur bei der Annahme von 2 Mol. Ölsäure, 2 Mol. Palmitinsäure, 2 Glycerinresten, 1 Mol. Cholin und

[1]) Durch einen von uns (*Grafe*) wurde auch eine fraktionierte Fällung in der Weise vorgenommen, daß die absoluten Bleimengen variiert wurden. Von einer und derselben neutralen Bleiacetatlösung wurden zunächst 10 Tropfen, im Filtrat von diesem Niederschlag weitere 10 Tropfen usf. zugesetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Die Niederschläge unterschieden sich weder in der Zusammensetzung noch im Aussehen, sondern lediglich durch ihre Filtrierbarkeit. Es wurde auch versucht, die Fällbarkeit der Filtrate durch leicht alkalisches oder saures Reaktionsmedium zu variieren. Über andersartige Resultate bei anderen Objekten wird später berichtet werden.

[2]) *H. v. Euler*, l. c.

vier Atomen Pb gegeben. Theoretisch würde sich also die folgende Zusammenstellung ergeben:

$2\,(C_{16}H_{32}O_2-H)$	. . . . =	510,66	(Palmitinsäure)
$2\,(C_{18}H_{34}O_2-H)$	. . . . . =	562,54	(Ölsäure)
$2\,(C_3H_5)$	. . . . =	82,10	(Glycerin)
$C_5H_{15}O_2N-2H$	. . . . =	120,00	(Cholin)
$2\,(H_3PO_4-H_2O)$	. . . . =	160,12	(Phosphorsäure)
4 Pb	. . . . =	828,80	(Blei)
	Summe . .	2264,22	
	Aus dem N-Gehalt ber. .	2243,00	

Die empirische Formel, welche diesen Spaltungsprodukten entsprechen würde, wäre dann

$$C_{79}H_{153}O_{16}P_2NPb_4.$$

Dieser Formel würden folgende Analysenwerte entsprechen:

	Gefunden Proz.	Berechnet Proz.
C	41,45	41,31
H	6,78	6,717
P	2,78	2,705
N	0,624	0,6104
Pb	36,10	36,11
O	—	12,55

Man könnte auf Grund der Befunde versuchen, eine Strukturformel des Phosphatids zu konstruieren, wobei nochmals auf das Hypothetische eines solchen Versuchs hingewiesen werden möge. Indessen ergibt sich auch bei einer solchen Konstruktion auf alle Fälle die Schwierigkeit der Einbeziehung der gefundenen vier Pb-Atome in die Formel. Es muß vor allem dahingestellt bleiben, ob es sich bei dem Vorhandensein des Pb im Molekül, obwohl alle Versuche eine bemerkenswerte Konstanz des Pb-Gehalts gezeigt hatten, um eine chemische Bindung dieses Elements oder nur um ein physikalisches Festgehaltensein desselben handelt.

Nach *W. Koch*[1]) handelt es sich „beim Lecithin nicht um chemische Reaktionen, wie z. B. die Bildung von unlöslichen Salzen, sondern um physikalische Niederschlagsreaktionen, wahrscheinlich elektrischer Natur. *Hofmeister* hat schon früher darauf hingewiesen, daß es sich bei den Fällungen aus kolloidalen Eiweißlösungen ebenfalls nicht um unlösliche Salze handelt“.

$$\begin{array}{ll} CH_2O\,.\,OC\,.\,C_{15}H_{31} & C_{17}H_{33}\,.\,CO\,.\,OCH_2 \\ | & \qquad\qquad\quad | \\ CH\;O\,.\,OC\,.\,C_{17}H_{33} & C_{15}H_{31}\,.\,CO\,.\,OCH\,.\,(+)\,4\,Pb \\ | & \qquad\qquad\quad | \\ \multicolumn{2}{l}{CH_2O\text{—}OP(OH)O\,.\,H_2C\,.\,CH_2.N(CH_3)_3\,.\,O(OH)POCH_2} \end{array}$$

[1]) *W. Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 181, 1902/03.

Wasserlösliches Phosphatid B.

Nach den Untersuchungen von *B. Hansteen-Cranner*, von denen in der Einleitung die Rede war, kann man aus dem Dialysat verschiedener Pflanzen mehrere Phosphatide verschiedener Eigenschaften isolieren, die sich vor allem durch ihre Fällbarkeit mit Schwermetallsalzen bzw. Alkohol unterscheiden.

Aus diesem Grunde versuchten auch wir, das Filtrat von der Bleiacetatfällung des wässerigen Dialysats (A-Phosphatid) noch auf das eventuelle Vorhandensein anderer Phosphatide zu untersuchen.

Das Filtrat der Bleiacetatfällung wurde durch Zutropfen eben hinreichender Mengen 5proz. H_2SO_4 entbleit und das ganz schwach saure Filtrat mit einigen Tropfen Ammoniak neutralisiert. Die Flüssigkeit wurde dann nach der vorhin beschriebenen Methode der schnellen Eindampfung bei möglichst niedriger Temperatur unterzogen und die wasserhelle Flüssigkeit darauf mit der fünf- bis siebenfachen Menge Alkohol versetzt, wobei ein weißer, kristallinischer Niederschlag entstand (B-Phosphatid). Die Voruntersuchung ergab, daß selbst solche Niederschläge, welche unter völlig gleichen Versuchsbedingungen erhalten worden waren, niemals Konstanz des P- und Aschengehalts zeigten, sondern darin voneinander recht abweichende Werte lieferten.

Zur Illustration dieses Verhaltens mögen einige Zahlen unseres Versuchsprotokolls angeführt werden, welche Fällungen betreffen, die mit gleichen Mengen Phosphatidlösung, bei gleichen Konzentrationen des Fällungsmittels und gleichen Zeit- sowie Temperaturverhältnissen ausgeführt worden waren.

0,3685 g Substanz ergaben 0,0069 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,001916 g P = **0,52 Proz. P.**
0,5286 g Substanz ergaben 0,0264 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,007347 g P = **1,38 Proz. P.**
0,4237 g Substanz ergaben 0,0283 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,00788 g P = **1,86 Proz. P.**
0,9342 g Substanz ergaben 0,5457 g Asche, entsprechend **57,08 Proz.**
0,5638 g Substanz ergaben 0,2631 g Asche, entsprechend **45,71 Proz.**

Die Asche wurde lediglich qualitativ untersucht, wobei große Mengen von Ca und Mg und Na in Spuren gefunden wurden.

Da auch die gefundenen Werte des N sehr wechselnde waren, und dieses Element mitunter sogar nur in unmeßbaren Spuren sich vorfand, einheitliche Produkte aber durch kein Fällungsmittel zu erhalten waren, andererseits aber die sonst für Phosphatide üblichen Schwermetallfällungsmittel ganz versagten und schließlich überhaupt die Menge der Alkoholfällung nicht mehr als höchstens ein Drittel des zuerst gewonnenen A-Phosphatids betrug, wurde von einer Isolierung dieses fraglichen Phosphatids Abstand genommen. Was die großen vor-

gefundenen Aschenmengen betrifft, so konnten diese einerseits direkt aus dem Mineralbestand der dialysierten Schnitte stammen, andererseits konnte auch die Anschauung von *G. Trier*[1]) realisiert sein, nach welcher durch Abspaltung von Cholin aus dem Phosphatid der Platz zur Aufnahme von anorganischen Basen frei wird, wodurch sich nach dem genannten Autor die nicht unbeträchtlichen Mengen an Ca und anderen Kationen erklären würden, die sich mitunter in Lecithinpräparaten finden.

Um wenigstens einige Anhaltspunkte über die chemische Natur dieser Phosphatidfällung zu erhalten, wurde dieselbe einem Abbau mit 5 proz. H_2SO_4 unterworfen.

Spaltung mit 5 proz. H_2SO_4.

15,315 g der Alkoholfällung wurden im Jenaerkolben mit 180 ccm 5proz. H_2SO_4 über freier Flamme am Rückflußkühler durch 8 Stunden gekocht, die trübe hellgelbe Flüssigkeit nach dem Abfiltrieren vom mineralischen Rückstand im Scheidetrichter andauernd mit Äther ausgeschüttelt, wobei sich schließlich unterhalb der gelben ätherischen Schicht eine klare wässerige Flüssigkeit ergab.

Nach wiederholtem Ausschütteln derselben wurden sämtliche ätherische Extrakte vereinigt, der Äther verjagt, der hinterbleibende Rückstand löste sich in 96proz. Alkohol, war aber in Wasser weder löslich noch davon benetzbar. Die alkoholische Lösung ergab nach Eindunsten im Vakuum über H_2SO_4 ein ganz trockenes mikrokristallinisches Residuum, welches zwischen 43 bis 55° schmolz. Zu einer weiteren Bestimmung war die erhaltene Menge zu gering. Es konnte sich also entweder um ein Gemenge derselben Fettsäuren handeln, wie sie im A-Phosphatid gefunden worden waren, oder um andersartige. Darüber konnten unsere Versuche vorläufig noch keinen Aufschluß geben.

Die ausgeätherte wässerige Flüssigkeit gab deutliche Reaktion auf H_3PO_4, ferner die typischen Farbenreaktionen der Zuckerarten mit α-Naphthol + H_2SO_4, deutliche Reduktion der *Fehling*schen Lösung und starke Fällung mit Phosphorwolframsäure. Zur Ausfällung der Base wurde daher der größte Teil der wässerigen Lösung mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt und der Niederschlag mit 5proz. H_2SO_4 nachgewaschen. Nach der Spaltung mit Baryt und Reinigen des Filtrats mit CO_2 wurde das Filtrat nach Ansäuern mit HCl eingedampft, der ganz geringe kristallinische Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen, im Vakuum eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit $PtCl_4$-Lösung versetzt. Es ergab sich nach

[1]) *G. Trier*, Chemie der Pflanzenstoffe, S. 437. Berlin 1924.

Auskristallisieren aus Wasser bzw. Alkohol, das durch seinen Dimorphismus charakterisierte Cholin-Chloroplatinat.

Das Filtrat von der Fällung mit Phosphorwolframsäure wurde mit festem Baryt digeriert, der entstandene Niederschlag abfiltriert, in Wasser suspendiert und unter einstündigem Kochen CO_2 eingeleitet. Die von den Ba-Salzen abfiltrierte Lösung zeigte starke Reduktion der *Fehling*schen Lösung und ergab nach Eindampfen die charakteristischen Kristalle des Rohrzuckers, welche offenbar als Begleitstoffe der Alkoholfällung des Phosphatids mitgefällt worden waren. Das mit Baryt gereinigte Filtrat nach der Phosphorwolframsäurefällung wurde weiter eingedampft, mit Alkohol versetzt und dadurch eine kleine Menge eines flockigen Niederschlags erhalten. Dieser Niederschlag in Wasser gelöst, ergab:

1. mit H_2SO_4 einen schweren weißen Niederschlag ($BaSO_4$).
2. mit HNO_3 und Ammonmolybdat deutliche Reaktion auf Phosphorsäure,
3. mit $KHSO_4$ erwärmt, deutlichen Geruch nach Acrolein (Glycerin).

Die Spaltung dieses Phosphatidanteils hat also neben nicht näher bestimmten Fettsäuren noch mit Sicherheit Phosphorsäure und Cholin, sowie in ganz geringen Mengen Glycerin-Phosphorsäure ergeben.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich nicht ohne weiteres der von anderen Autoren gezogene Schluß auf das Vorhandensein eines besonderen, durch Alkohol fällbaren Phosphatids bestätigen. Es ist vielmehr ebensogut möglich, daß es sich hier um dasselbe Phosphatid handelt, wie es sich bei der Fällung mit Bleiacetat ergeben hatte, etwa nur denaturiert durch die vorhergegangenen Operationen und dadurch der Aufnahme von Erdalkalien zugänglich gemacht, wodurch auch seine Lösungs- und Fällbarkeitsverhältnisse verändert sein konnten.

Über das Pringsheimsche Komplement der Amylasen.

Von

Knut Sjöberg.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 18. April 1925.)

In einigen Mitteilungen[1]) haben *Pringsheim* und seine Mitarbeiter mehrere Versuche beschrieben, in denen die Verzuckerung der Stärke durch Amylasen (Malz, Pankreas und Speichel) bis zur Bildung von 100 Proz. Maltose fortgegangen ist; dies unter Mitwirkung von mit Toluol behandelter Hefe. Sie nehmen deshalb an, daß in der Hefe ein Komplement vorhanden ist, das die bei der Hydrolyse der Stärke nur mit Amylase entstehenden Hexosane[2]) in Maltose überführt. Indessen ist es *Holmbergh*[3]) nicht gelungen, im hiesigen Laboratorium unter Anwendung Stockholmer Hefe eine Komplementwirkung zu erhalten. Ich habe deshalb auf Veranlassung *Pringsheims* einige Versuche mit seinen Komplementpräparaten und Malzauszüge aus Stockholmer Malz ausgeführt. Bei den Versuchen, welche unten näher beschrieben sind, kamen zwei Komplementpräparate zur Benutzung. In den Versuchen mit dem einen Präparat trat eine deutlich aktivierende Wirkung bei der langsamen Nachverzuckerung zutage; mit dem anderen wurde keine Beschleunigung beobachtet; vielleicht war hier das Komplement während des Transports zerstört worden. Das Komplement zeigte eine ziemlich große Temperaturstabilität. Auch durch einstündiges Erhitzen bei 80° wurde keine Veränderung in der aktivierenden Wirkung beobachtet. Da das Komplement nicht isoliert worden war — die Hefeverschlämmung wurde ohne weitere Behandlung verwendet —, ist zu erwarten, daß diese eine große Schutzwirkung ausübt. *Pringsheim* hat früher gefunden, daß die Komplementwirkung beim Kochen aufgehoben wird. In Übereinstimmung damit, daß meine Amylaselösung

---

[1]) *Pringsheim* und *Fuchs*, Ber. **56**, 1762, 1923; *Pringsheim* und *Schmalz*, diese Zeitschr. **142**, 108, 1923; *Pringsheim* und *Beiser*, ebendaselbst **148**, 336, 1924.

[2]) *Pringsheim* und *Beiser*, l. c.; *Sjöberg*, Ber. **57**, 1251, 1924.

[3]) *Holmbergh*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 68, 1924.

in Gegensatz zu denjenigen *Pringsheims* auch nicht Amylose vollständig in Maltose überführt, sondern zum Teil ein sehr schlecht spaltbares Dihexosan liefert[1]), wurde auch in Amyloselösungen Komplementwirkung beobachtet. Es ist also deutlich, daß in gewissen Hefesorten ein ziemlich hitzebeständiger Körper zu finden ist, der auf die Verzuckerung der Hexosane aktivierend einwirkt und durch welchen die Stärke folglich ganz in Maltose überführt werden kann.

Beschreibung der Versuche.

Versuch 1.

Verlauf der Spaltung von löslicher Stärke mit dialysiertem Malzauszug mit und ohne Komplement. Temperatur 37°.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische. Lösung St.: 0,920 g trockene Stärke, 10 ccm Phosphatpuffer p_H 5,2, 2 ccm Malzauszug, 88 ccm Wasser. Lösung St. + K.$_1$: Stärke, Puffer und Malzauszug wie vorige, 2 ccm Komplement 1, 86 ccm Wasser. Lösung St. + K.$_2$: wie vorige aber mit 2 ccm Komplement 2.

Tabelle I.

Zeit	mg Maltose			Proz. Maltose		
	St.	St. + K.$_1$	St. + K.$_2$	St.	St. + K.$_1$	St. + K.$_2$
15 Min. . . .	14,1	16,5	17,0	29,0	34,0	34,0
30 „ . . .	22,5	24,9	22,5	46,5	51,4	46,5
60 „ . . .	24,2	25,8	24,9	50,0	53,1	51,4
4 Std. . . .	27,4	26,5	25,8	56,5	54,6	53,1
24 „ . . .	30,7	39,3	31,5	63,3	81,0	65,0
72 „ . . .	36,6	39,3	36,6	75,5	81,0	75,5
96 „ . . .	36,6	41,7	39,3	75,5	86,0	81,0
144 „ . . .	41,7	47,7	40,9	86,0	98,5	84,1
168 „ . . .	41,7	48,6	41,7	86,0	100,0	86,0
192 „ . . .	45,3	49,1	41,7	93,5	101,1	86,0
240 „ . . .	46,5	49,1	43,5	96,0	101,1	89,6

Tabelle II.

Zeit	mg Maltose			Proz. Maltose		
	St.	St. + K.$_1$	St. + K.$_2$	St.	St. + K.$_1$	St. + K.$_2$
15 Min. . . .	14,1	15,7	16,5	29,1	32,4	34,0
30 „ . . .	23,3	24,9	24,9	48,0	51,4	51,4
60 „ . . .	24,2	26,5	25,8	50,0	54,6	53,1
24 Std. . . .	31,5	34,2	33,4	65,0	70,5	69,0
48 „ . . .	35,1	36,6	33,4	72,4	75,5	69,0
72 „ . . .	39,3	39,3	36,6	81,0	81,0	75,5
96 „ . . .	40,9	45,3	39,3	84,1	93,5	81,9
120 „ . . .	40,9	46,1	40,2	84,1	95,3	83,0
168 „ . . .	43,5	46,1	41,7	89,6	95,3	86,0

[1]) *Sjöberg*, l. c.

Tabelle III.

Zeit	mg Cu		
	$K._1$	Maltose + $K._1$	Maltose + $K._2$
0 Min. .	0	58,0	54,3
24 Std. .	0	58,0	56,2
72 „ .	0	60,0	54,3
96 „ .	—	59,0	55,2
192 „ .	—	59,0	—
240 „ .	—	60,0	55,2

In den Tabellen I und II sind die Maltosemenge in 5 ccm der Reaktionsgemische angegeben. Für Reduktionsvermögen der Enzymlösung und des Komplements ist korrigiert.

Um zu prüfen, ob das Komplement selbst Amylase- oder Maltasewirkung besitzt, sind die in Tabelle III angegebenen Serien ausgeführt worden. Lösung $K._1$ ist wie Lösung St. + $K._1$ mit Ausnahme des Malzauszugs zusammengesetzt. Die Lösungen Maltose + $K._1$ und Maltose + $K._2$ enthalten etwa 1 Proz. Maltose, Phosphatpuffer p_H 5,2 und 2 ccm Komplement.

Aus diesen drei Tabellen geht hervor, daß die Maltosebildung in Gegenwart von Komplement 1 vollständig wird, und daß die Verzuckerung in diesem Falle in späteren Stadien rascher vor sich geht. Aus Tabelle III geht ferner hervor, daß eine Maltasewirkung durch die Hefe ausgeschlossen ist.

Versuch 2.

Verlauf der Spaltung von Amylose und Amylopektin mit dialysiertem Malzauszug mit und ohne Komplement. Temperatur 37°.

Zusammensetzung der Reaktionsgemische. Lösung Amylop.: 0,430 g Amylopektin, 10 ccm Citratpuffer p_H 5,0, 2 ccm Malzauszug, 88 ccm Wasser. Lösung Amylop. + $K._1$: wie vorige mit Zusatz von

Tabelle IV.

Zeit	mg Maltose				Proz. Maltose			
	Amylopektin	Amylose	Amylop. + $K._1$	Amylose + $K._1$	Amylopektin	Amylose	Amylop. + $K._1$	Amylose + $K._1$
15 Min.	—	15,7	—	19,9	—	34,6	—	43,9
30 „	—	19,9	—	21,6	—	43,9	—	47,6
60 „	—	—	—	27,4	—	—	—	60,5
24 Std.	—	25,8	—	29,0	—	56,8	—	64,0
48 „	22,2	28,8	33,0	32,5	49,0	63,5	72,8	71,6
72 „	27,0	—	35,0	—	59,5	—	77,2	—
96 „	—	—	36,6	—	—	—	80,7	—
120 „	37,5	33,4	40,2	35,8	82,8	73,5	88,6	79,0
144 „	38,1	34,2	41,0	43,5	84,0	75,4	90,5	96,0
216 „	38,9	—	41,7	—	85,9	—	92,0	—
240 „	41,5	—	45,3	—	91,5	—	100,0	—

1 ccm Komplement 1. Lösung Amylose: 0,430 g Amylose, 10 ccm Citratpuffer p_H 5,0, 2 ccm Malzauszug, 88 ccm Wasser. Lösung Amylose + K.$_1$: wie vorige mit Zusatz von 1 ccm Komplement 1.

Für die Zuckeranalysen wurden 10 ccm genommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zu finden.

Auch in diesen Versuchsreihen ist es deutlich, daß das Komplement eine vollständige Spaltung der Stärke bewirkt.

Versuch 3.

Verlauf der Spaltung von löslicher Stärke mit dialysiertem Malzauszug mit und ohne erhitztem Komplement. Reaktionstemperatur 37⁰.

Die Zusammensetzung der Lösungen wie in Versuch 1. 0,945 g lösliche Stärke, Komplement 1. 2 ccm Komplement wurden mit 10 ccm Wasser versetzt und die Mischung während 1 Stunde im Wasserbad erhitzt und dann sofort das Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle V angegeben. Die Werte beziehen sich auf 5 ccm des Reaktionsgemisches.

Tabelle V.

Zeit	mg Maltose				Proz. Maltose			
	ohne K.	mit K. nicht erhitzt	mit K. erhitzt bei 60⁰	mit K. erhitzt bei 80⁰	ohne K.	mit K. nicht erhitzt	mit K. erhitzt bei 60⁰	mit K. erhitzt bei 80⁰
24 Std.	31,3	38,0	40,4	38,0	62,5	76,0	80,7	76,0
72 „	35,1	41,7	40,8	41,3	70,1	83,5	81,6	82,6
120 „	36,0	41,7	42,6	41,7	72,0	83,5	85,3	83,5
168 „	37,0	50,1	46,4	46,4	74,0	100,2	92,7	92,7
240 „	—	—	50,1	—	—	—	100,2	—

Die Erhitzung der Hefeverschlämmung von 1 Stunde bei 80⁰ hat nicht die aktivierende Wirkung beeinflußt.

Eine Methode zur Proteinbestimmung in 0,1 ccm Serum.

Von

Sigrid Holm und Helgi Tómasson.

(Aus der Staatsirrenanstalt Oringe bei Vordingborg, Dänemark.)

(Eingegangen am 22. April 1925.)

Mehrere Forscher haben im Laufe der letzten Jahre die Serumproteinmenge durch Refraktometrie, Kjeldahlanalysen, Wägung oder Kolorimetrie bestimmt. Andere haben die Verdünnung des Serums mit Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung versucht, die Versuche aber aufgegeben auf Grund der Ungenauigkeit und Inkonstanz der gefundenen Werte.

Von den brauchbaren Methoden hat sich namentlich *Pulfrichs* refraktometrische Methode als klinisch anwendbar erwiesen. Sie fordert aber einen sehr kostspieligen Apparat, und es herrscht keine Übereinstimmung über die Richtigkeit der bei der Berechnung anzuwendenden Tabellen.

Es scheint schon berechtigt, die Bestimmung der totalen Proteinmenge im Serum in die Reihe der klinischen Untersuchungsmethoden, namentlich der chirurgischen (Tumordiagnostik und -prognostik), aber auch der internmedizinischen aufzunehmen. Wir erlauben uns daher, auf eine klinisch leicht anwendbare, billige und, wie es scheint, sehr zuverlässige Methode, die wir ausgearbeitet und seit einiger Zeit angewandt haben, aufmerksam zu machen.

Unsere Methode beruht auf dem gleichen Prinzip, wie es von *Brandberg* zur Albumenbestimmung im Urin, *Pfaundler*, *Grahe*, *Zaloziecki* und *Bisgaard* in Spinalflüssigkeit angewandt worden ist: Bestimmung der äußersten Verdünnungsgrenze des Serums, wo man eben *Hellers* Reaktion bekommt. Unter den anzuführenden Bedingungen gleicht dies einem Eiweißgehalt von $^1/_{60}$ Prom., infolge *Zalozieckis* Bestimmungen, die wir ursprünglich unseren Berechnungen zugrundegelegt haben. Die gefundenen Werte haben wir später kontrolliert, teils durch Kjeldahlanalysen, teils durch Multiplikation mit einem von *Bisgaard* gewichtsanalytisch bestimmten Faktor *a*, „mit dem die die Verdünnung angebende Zahl multipliziert werden soll, um das Gewichtsprozent zu ermitteln“.

Im Gegensatz zu anderen Verdünnungsmethoden wenden wir eine *Ringer*lösung von der folgenden Zusammensetzung als Verdünnungsflüssigkeit an:

$$0{,}8\ NaCl \quad 0{,}1\ NaHCO_3 \quad 0{,}075\ KCl \quad 0{,}10\ CaCl_2 + 6\ H_2O,$$

d. h. eine Lösung mit einem p_H von etwa 11 und einem relativ großen Elektrolytgehalt.

Die Ausführung der Methode.

0,1 ccm Serum wird so genau wie möglich in ein gut gereinigtes, trockenes, gewöhnliches Reagenzglas abpipettiert.

20 ccm Ringerlösung werden sofort hinzugefügt; dabei muß man die Bildung von Schaum vermeiden.

Die so entstandene Standardlösung (= Standard A) kann 12 bis 24 Stunden ohne Schaden stehen bleiben, bis man die Untersuchung fortsetzen kann.

Die Untersuchung wird in folgender Weise vorgenommen:

Genau 0,06 ccm von Standard A werden in eines der kleinen, der Methode zugehörenden Reagenzgläser abpipettiert, und man fügt 0,94 ccm Ringerlösung hinzu. In eine spitze 1-ccm-Pipette saugt man 1 ccm acidum nitricum purum (spezifisches Gewicht 1,18) auf; die Pipette wird durch die im kleinen Reagenzglas sich befindende Mischung bis zum Boden des Reagenzglases geführt; die HNO_3 läßt man *vorsichtig* herauslaufen, indem man genau darauf acht gibt, daß die Grenze zwischen der HNO_3 und der überstehenden proteinhaltigen Ringerlösung deutlich und scharf sei. Das Reagenzglas wird danach in den der Methode zugehörenden lichtdichten, schwarzen Kasten, („*Bisgaards* Apparat") gestellt, und nach *genau* 3 Minuten sieht man nach, ob sich eine weiße Ausfällung auf der Grenze zwischen den Flüssigkeiten wahrnehmen läßt.

Man kann +, +?, ÷? und ÷ ablesen; dabei ist ÷? „negative Reaktion", wie auch ÷, während +? positive Reaktion ist, wie +.

+ bei 0,06 ccm von Standard A plus 0,94 ccm Ringer repräsentiert die unterste Normalgrenze der Serumproteinkonzentration, d. h. wenn 0,06 ccm von Standard A plus 0,94 ccm Ringerlösung negative Reaktion geben, so ist die Totalproteinmenge im Serum herabgesetzt.

Wenn 0,06 ccm von Standard A plus 0,94 ccm Ringer positive Reaktion geben, werden in ein neues kleines Reagenzglas 0,03 ccm von Standard A plus 0,97 ccm Ringerlösung abpipettiert, mit 1 ccm HNO_3 unterschichtet, Ablesung im Schwarzkasten nach genau 3 Minuten.

Wenn 0,03 ccm von Standard A plus 0,97 ccm Ringer positive Reaktion geben, so ist die Totalproteinmenge im Serum bedeutend vermehrt.

Erweist sich die Proteinmenge weder herabgesetzt noch vermehrt, so untersucht man, ob 0,04 ccm von Standard A plus 0,96 Ringer positive Reaktion geben, denn + *bei 0,04 ccm von Standard A repräsentiert die oberste Normalgrenze der Serumproteine.*

Wenn 0,04 ccm von Standard A plus 0,96 ccm Ringerlösung negativ sind, wird man mit 0,05 ccm von Standard A plus 0,95 ccm Ringerlösung untersuchen. Man findet in dieser Weise, zwischen welchen zwei Verdünnungen die Verdünnungsgrenze des vorhandenen Normalserums, wo man eben *Hellers* Reaktion bekommt, liegt, und aus der beigefügten Tabelle I geht das hierzu gehörende Proteinprozent hervor.

Wenn die 0,06 ccm von Standard A plus 0,94 ccm Ringerlösung negative Reaktion geben — handelt es sich um herabgesetzte Proteinmengen —, wird man in analoger Weise die Verdünnungsgrenzen systematisch aufsuchen, bis man die zwei gefunden hat, wo man eben negative und eben positive Reaktion bekommt; zwischen den so gefundenen Verdünnungen mit ihren zugehörigen Proteinprozenten liegt das Proteinprozent des untersuchten Serums.

Man geht z. B. in folgender Weise vor:

Nachdem 0,06 ccm von Standard A plus 0,94 ccm Ringerlösung sich als negativ erwiesen haben, untersucht man, ob 0,10 ccm von Standard A plus 0,90 ccm Ringerlösung positive Reaktion geben, wenn nicht, muß man mit 0,12 oder 0,14 ccm von Standard A plus bzw. 0,88 oder 0,86 ccm Ringerlösung versuchen; geben 0,10 ccm von Standard A plus 0,90 ccm Ringerlösung dagegen +, untersucht man mit 0,08 ccm von Standard A plus 0,92 ccm Ringerlösung, wenn diese Verdünnung ÷ oder ÷ ? gibt, wird mit 0,09 ccm von Standard A plus 0,91 ccm Ringerlösung versucht; man findet in dieser Weise, daß die Verdünnungsgrenze zwischen 0,08 und 0,09 ccm von Standard A plus bzw. 0,92 und 0,91 ccm Ringerlösung, oder zwischen 0,09 und 0,10 ccm von Standard A plus bzw. 0,91 und 0,90 ccm Ringerlösung liegt. Das zu diesen Verdünnungen gehörende Proteinprozent findet man in der Tabelle I.

Wenn 0,03 ccm von Standard A plus 0,97 ccm Ringerlösung positive Reaktion geben — d. h. die Serumproteine vermehrt sind —, wird mit 0,02 (bzw. 0,01) ccm von Standard A plus 0,98 ccm Ringerlösung untersucht, doch empfiehlt sich in allen Fällen, wo man eine Proteinvermehrung findet oder vermutet, die Bestimmung in der zu beschreibenden Standardlösung B vorzunehmen.

Bei der Bestimmung von normalen oder subnormalen Proteinwerten mittels Standard A wird man gewöhnlich zwei bis sechs Ablesungen vorzunehmen haben, was 10 bis 30 Minuten erfordert.

Hat man vermehrte Proteinkonzentration zu bestimmen, oder wünscht man, die Bestimmungen sehr genau angeben zu können,

z. B. zwecks Tagesschwankungen zu folgen, oder andere Serienuntersuchungen vorzunehmen, so empfiehlt sich, *außer* der Bestimmung mittels Standard A auch eine Bestimmung in einem neuen *Standard B* vorzunehmen. Dieser wird hergestellt, indem man *1 ccm Standard A mit 4 ccm Ringerlösung verdünnt.*

Die Untersuchung mittels Standard B geschieht in folgender Weise:

Auf der Tabelle I sieht man, daß zwischen je zwei zum Standard A gehörenden Verdünnungszahlen sich vier andere Verdünnungszahlen befinden. In Kolonnen 4 und 5 befinden sich die jeder in Kolonne 3 angegebenen Verdünnungen entsprechenden Mengen von Standard B (Kolonne 4) mit Ringerlösung (Kolonne 5) weiter verdünnt.

Mittels Standard A hat man die Verdünnungsgrenzen zwischen zwei diesem angehörenden Verdünnungszahlen bestimmt. Entsprechend einer der mittelsten zwischen diesen Zahlen interpolierten Verdünnungszahlen nimmt man die angegebene Menge von Standard B in ein kleines Reagenzglas, verdünnt mit Ringerlösung auf 1,0 ccm, unterschichtet mit 1 ccm HNO_3 und liest ab im Schwarzkasten nach genau 3 Minuten.

Nachdem diese Verdünnung positiv oder negativ ausfällt, untersucht man die nächst obere oder nächst untere, bis man die Grenze zwischen zwei dem Standard B angehörenden Verdünnungen findet; die diesen Verdünnungen entsprechenden Proteinprozente findet man in Kolonne 6; der Proteingehalt des untersuchten Serums liegt zwischen den zwei so gefundenen Werten.

Z. B.: Ein Normalserum gibt mittels Standard A + bei 0,05 plus 0,95 und ÷? bei 0,04 plus 0,96, den Verdünnungen 4000 und 5000 entsprechend; diesen entsprechen 0,25 und 0,20 ccm von Standard B plus bzw. 0,75 und 0,80 ccm Ringerlösung. Die nähere Untersuchung mittels Standard B ergibt folgendes:

0,23 ccm	Standard	„B"	plus	0,77	Ringer:	+
0,21 „	„	„B"	„	0,79	„	÷
0,22 „	„	„B"	„	0,78	„	+?

d. h. die Verdünnungsgrenze liegt zwischen 0,21 und 0,22 ccm von Standard B plus bzw. 0,79 und 0,78 ccm Ringerlösung, d. h. zwischen den Verdünnungen 4761 und 4545, die 7,94 und 7,57 Proz. Protein entsprechen; das untersuchte Serum enthält 7,75 Proz. Totalprotein.

Man kann auf diese Weise Schwankungen im Serumproteingehalt von 0,10 bis 0,70 Proz. verfolgen, wenn es sich um Sera handelt, die normalen oder subnormalen Proteingehalt haben.

Sind die Proteine vermehrt, kann man sie mit 1 bis 3 Proz. Genauigkeit bestimmen. Wenn man eine eventuelle Proteinvermehrung genauer angeben will, muß man neue Reihen zwischen den zum Standard B gehörenden einsetzen und dann das Proteinprozent berechnen, indem

man die Verdünnungszahl durch 60000 dividiert und die so gefundene Zahl durch 100.

Für normal und subnormal proteinhaltige Sera wird es sich nicht lohnen, Standard B weiter zu verdünnen als 1,0 ccm von Standard A plus 4,0 ccm Ringerlösung, denn sonst wird man Fehlern ausgesetzt, die z. B. daher rühren, daß man die Venenpunktion mittels Stase vorgenommen hat.

Die angewandten Reagenzien und Apparate.

1. *Ringerlösung*: 0,8 NaCl, 0,1 $NaHCO_3$, 0,075 KCl, 0,01 $CaCl_2 + 6\,H_2O$.

Muß filtriert werden und nicht mehr als 1 Monat alt sein. Eine Ringerlösung von der angeführten Zusammensetzung mit redestilliertem Wasser zubereitet, hat p_H etwa 11.

2. *Acidum nitricum purum*: Offizinell 25 Proz., spezifisches Gewicht 1,18.

3. *Glaswaren*: Drei justierte Differentialpipetten à 1 ccm, in 0,01 ccm eingeteilt; die unsrigen haben 2 mm zwischen den Teilstrichen. Die eine ist zur Abpipettierung von Serum bestimmt, die zweite für die Standardlösungen und die dritte für die Ringerlösung. Eine spitz herausgezogene 1-ccm-Auslaufpipette für HNO_3. Eine Anzahl, z. B. 12, kleiner Reagenzgläser 10 × 130 mm und eine Anzahl gewöhnlicher Reagenzgläser.

4. *Bisgaards Apparat zur Untersuchung von Spinalflüssigkeit*: Ein innen schwarzer Kasten mit einer horizontalen Spalte in der Vorderseite und einem runden Loch im Deckel. In das Loch stellt man das kleine Reagenzglas, dessen Inhalt man untersuchen will; dabei sollte die Grenze der zwei Flüssigkeiten im Niveau der horizontalen Spalte, durch welche man die Reaktion betrachtet, liegen. Eine elektrische Lampe ist in fixierter Entfernung über dem Loch angebracht und das ganze wird von einem der Höhe nach einstellbaren Träger getragen. Die elektrische Lampe ist horizontal so drehbar, daß man genau in das zu untersuchende Reagenzglas hinunterleuchten kann.

Ein anderer, sehr anwendbarer Apparat, ist ein Diaphanometer, analog dem von *Lebermann* bei Kalium- und Natriumbestimmungen angewandten[1]).

Die gewonnenen Resultate.

Wir haben 23 erwachsene Normalpersonen (Pflegepersonal) von mittlerer Ernährung untersucht; davon sind 7 Männer und 16 Frauen. Außerdem ist eine größere Anzahl Patienten mit den verschiedensten psychischen und somatischen Krankheiten untersucht worden. Es wird hier nur über die Einzelresultate bei Normalpersonen berichtet. Aus später anzuführenden Gründen sind Frauen nur in den Intermenstrualperioden als „Normalpersonen" für Blutuntersuchungen zu betrachten.

Die Blutgewinnung erfolgte stets durch Venenpunktion, unter nur vorübergehender Stase, morgens nüchtern, 10 bis 12 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, nach 1½ bis 2 Stunden Morgenarbeit

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, Heft 3/4, 1924.

Tabelle I.

Standard A ccm	Ringer	Verdünnung	Standard B	Ringer	Totalprotein pro 100 ccm
0,01	0,99	20,000	0,05	0,95	33,33
		16,666	0,06	0,94	27,77
		14,285	0,07	0,93	23,80
		12,500	0,08	0,92	20,83
		11,111	0,09	0,91	18,50
0,02	0,98	10,000	0,10	0,90	16,66
		9,090	0,11	0,89	15,15
		8,333	0,12	0,88	13,88
		7,692	0,13	0,87	12,94
		7,142	0,14	0,86	11,90
0,03	0,97	6,660	0,15	0,85	11,11
		6,250	0,16	0,84	10,38
		5,882	0,17	0,83	9,80
		5,555	0,18	0,82	9,26
		5,263	0,19	0,81	8,77
0,04	0,96	5,000	0,20	0,80	8,33
		4,761	0,21	0,79	7,94
		4,545	0,22	0,78	7,57
		4,348	0,23	0,77	7,25
		4,166	0,24	0,76	6,95
0,05	0,95	4,000	0,25	0,75	6,67
		3,846	0,26	0,74	6,41
		3,703	0,27	0,73	6,16
		3,571	0,28	0,72	5,95
		3,448	0,29	0,71	5,74
0,06	0,94	3,333	0,30	0,70	5,55
		3,225	0,31	0,69	5,37
		3,125	0,32	0,68	5,20
		3,030	0,33	0,67	5,05
		2,911	0,34	0,66	4,85
0,07	0,93	2,857	0,35	0,65	4,76
		2,777	0,36	0,64	4,62
		2,702	0,37	0,63	4,50
		2,631	0,38	0,62	4,38
		2,565	0,39	0,61	4,29
0,08	0,92	2,500	0,40	0,60	4,16
		2,439	0,41	0,59	4,06
		2,380	0,42	0,58	3,96
		2,326	0,43	0,57	3,87
		2,273	0,44	0,56	3,77·
0,09	0,91	2,222	0,45	0,55	3,70
		2,174	0,46	0,54	3,52
		2,127	0,47	0,53	3,54
		2,083	0,48	0,52	3,46
		2,041	0,49	0,51	3,40
0,10	0,90	2,000	0,50	0,50	3,33
		1,960	0,51	0,49	3,26
		1,923	0,52	0,48	3,20
		1,886	0,53	0,47	3,14
		1,851	0,54	0,46	3,08
0,11	0,89	1,818	0,55	0,45	3,03
		1,785	0,56	0,44	2,97
		1,754	0,57	0,43	2,92
		1,724	0,58	0,42	2,87
		1,694	0,59	0,41	2,82
0,12	0,88	1,666	0,60	0,40	2,77

Im allgemeinen sind zwei, drei oder vier Parallelversuche pro Person gemacht worden, d. h. zwei, drei oder vier Standardlösungen A zubereitet; in jeder von diesen sind wieder ein bis vier Bestimmungen vorgenommen worden.

Sämtliche der untersuchten Normalmänner und Frauen in Intermenstrualperioden liegen zwischen 0,04 und 0,06 ccm von Standard A plus bzw. 0,96 und 0,94 ccm Ringerlösung, und zwar haben die meisten + bei 0,05 und ÷ oder ÷ ? bei 0,04 ccm von Standard A. In Übereinstimmung hiermit findet man bei der näheren Untersuchung mittels Standard B die äußersten Normalgrenzen für die Serumproteine 5,55 bis 8,77 Proz.; die Extremwerte findet man nur ganz ausnahmsweise, und namentlich sind Werte unter 6 Proz. nur zweifelhaft als Normalwerte zu bezeichnen.

Wie aus der Tabelle II hervorgeht, liegen die meisten Normalpersonen zwischen 6,49 und 8,14 Proz. Totalprotein, mit einem Mittelwert von 7,08 Proz.

Tabelle II.

Nr.	Geschlecht	Name	Protein Proz.	Mittel aus wie vielen Bestimmungen
1	♀	*E. O.*	7,57	5
2	♀	*M. E.*	6,53	3
3	♀	*E. M.*	7,77	2
4	♀	*E. J.*	6,62	5
5	♀	*E. P.*	8,14	2
6	♂	*Ch. P.*	6,53	9
7	♂	*K. L.*	6,55	5
8	♀	*E. D.*	5,90	6
9	♀	*D. B.*	8,06	4
10	♀	*S. H.*	8,22	4
11	♀	*J. H.*	7,89	3
12	♀	*E. H.*	6,91	3
13	♂	*H. N.*	6,07	3
14	♂	*H. P.*	7,89	3
15	♀	*P. P.*	6,53	3
16	♀	*E. N.*	6,49	4
17	♀	*N. W.*	6,74	3
18	♀	*O. C.*	7,22	3
19	♀	*Y. B.*	7,32	3
20	♀	*K. E.*	7,32	3
21	♂	*R. P.*	7,89	3
22	♂	*D. J.*	7,65	3
23	♂	*P. H.*	6,15	4
		Mittelwert	7,08	

Fehlerquellen und Fehlergrenzen.

Das Blut muß so lange und so schnell zentrifugiert werden, daß man sicher mit *Serum* und nicht mit Plasma arbeitet. Wir zentrifugieren zum mindesten 10 Minuten in einer elektrischen Zentrifuge von Tourenzahl 5000 pro Minute.

Schwächste Hämolyse veranlaßt zu hohe Werte.

Wenn 0,1 ccm Serum, vom Blutkuchen separiert, unverdünnt z. B. 4 Stunden bei zu hoher oder zu niedriger Temperatur steht, werden die Resultate weniger genau; Zimmertemperatur (10 bis 25° C) scheint nicht auf die Resultate einzuwirken. Es empfiehlt sich, immer das Serum sofort nach Abpipettierung zu verdünnen und den Standard „A“ bei Zimmertemperatur stehen zu lassen, bis die weitere Untersuchung erfolgen kann.

Der größte Versuchsfehler rührt aber von der mehr oder weniger genauen Abpipettierung des 0,1 ccm Serums her, weshalb es wichtig ist, diese so genau und so gleichartig wie möglich vorzunehmen.

Die kleinen Reagenzgläser, worin man die Bestimmungen macht, müssen homogen, gut gereinigt und trocken sein. Die Ablesung erfolge stets nach genau 3 Minuten.

Als Beispiel der Fehlergrenzen der Methode diene das folgende Versuchsprotokoll:

C. P., 35 Jahre, 174 cm hoch, 80 kg. Drei Standardlösungen „A“ werden zubereitet. Die Untersuchung von diesen gibt die in Tabelle III ersichtlichen Resultate.

Tabelle III.

	I		II	III	
0,03 (+ 0,97)					
0,04 (+ 0,96)	÷	÷ ?	÷ ?	÷ ?	÷
0,05 (+ 0,95)	+	+	+	+	+
0,06 (+ 0,94)	+	+	+	+	+
0,07 (+ 0,93)					

D. h. I. und III. Standard „A“ geben 7,50, 7,50, 7,50, 7,50 Proz., während der II. 8,33 Proz. gibt. (Die + ? bei 0,04 sagen, daß die Verdünnungsgrenze *nicht* einer höheren Verdünnung als 5000 entspricht.) Der Durchschnitt dieser fünf Bestimmungen ist 7,66 Proz. Der größte Unterschied zwischen zwei Einzelbestimmungen ist 0,83 Proz. Der Durchschnittsfehler ist 0,28 Proz. in dem vorhandenen Falle, in einzelnen anderen aber bis 0,43 Proz. gefunden.

Wenn wir dasselbe Serum mittels drei Standardlösungen „B“, die von der I., II. und III. Standardlösung „A“ hergestellt sind, untersuchen, ergibt sich das in Tabelle IV ersichtliche Resultat:

Tabelle IV.

	I		II	III	
0,25 (+ 0,75)	+				
0,24 (+ 0,76)	+				
0,23 (+ 0,77)			+		
0,22 (+ 0,78)	+	+	+?	+	+
0,21 (+ 0,79)	÷	÷?	÷	÷?	÷
0,20 (+ 0,80)	÷				

D. h. in der I. und III. Standardlösung B finden wir 7,75, 7,75, 7,75 7,75 Proz., in der II. 7,57 Proz. Der Durchschnitt dieser fünf Bestimmungen ist 7,71 Proz.; der größte Unterschied zwischen zwei Einzelbestimmungen ist 0,18 Proz., der Durchschnittsfehler ist 0,06 Proz.

Der Unterschied zwischen dem mittels Standard A gefundenen Mittelwert, 7,66 Proz., und dem mittels Standard B gefundenen, 7,71 Proz., ist 0,05.

Kontrollbestimmungen.

Dr. *Henry Lind,* Assistent des Hospitals, hat freundlichst einige Kjeldahlanalysen von denselben Sera, die wir mittels unserer Methode untersucht haben, gemacht.

Der Vergleich geht aus Tabelle V hervor.

Tabelle V.

	Kjeldahlanalysen		Mit der beschriebenen Methode gefunden	Differenz	
	Total-N pro 1 ccm mg	Alb.-Proz. ÷ Rest-N	Proz.		Gleich mg N
Dr.	13,6	8,18	8,14	÷ 0,04	0,064
C. P.	12,5	7,50	7,71	+ 0,21	0,336
C. P.	12,5	7,50	7,71	+ 0,21	0,336
E. H.	11,1	6,62	6,41	÷ 0,21	0,336
E. H.	11,7	7,00	6,41	÷ 0,59	0,944
E. H.	11,5	6,87	6,41	÷ 0,46	0,736
E. H.	11,6	6,93	6,41	÷ 0,52	0,832

(Man vergleiche auch die Kjeldahlanalysen unter sich.)

Im Laufe seiner Untersuchungen über die Spinalflüssigkeit hat *Bisgaard* gewichtsanalytisch einen Faktor $a = 0{,}00170$ bestimmt, mit dem die die Verdünnung angebende Zahl multipliziert werden soll, um das Gewichtsprozent zu ermitteln. Wenn dieser Faktor auch für die Serumproteine Gültigkeit hat, gibt auch die Multiplikation mit ihm eine ziemlich gute Übereinstimmung mit den von uns gefundenen Werten (s. Tabelle VI).

Tabelle VI.

	Durch Multiplikation der Verdünnungszahl durch 0,00170 Proz.	Mit der neuen Methode gefunden Proz.	Differenz Proz.
Dr.	8,29	8,14	÷ 0,15
C. P.	7,72	7,71	÷ 0,01
E. H.	6,54	6,41	÷ 0,13

Schlußbemerkungen.

Man sieht also, daß die Resultate der Methode sich mit den Resultaten von Kjeldahlanalysen oder einer anderen ganz wesensverschiedenen Methode vergleichen lassen. Die gefundenen Normalwerte erweisen sich auch in Übereinstimmung mit den durch die verschiedensten Methoden und von den verschiedensten Untersuchern gefundenen Normalwerten, nur sind unsere Normalgrenzen bedeutend weiter auseinander gelegen, als es verschiedene andere Untersucher angeben. Unsere Grenzwerte sind ungefähr gleich der höchsten obersten

Normalgrenze und der niedrigsten untersten Normalgrenze. Dies rührt vielleicht daher, daß die von uns untersuchte Anzahl Normalpersonen etwas größer ist, als die von jeden anderen uns bekannten Einzeluntersuchern, sowie auch vielleicht daher, daß andere Untersucher nicht angegeben haben oder nicht darauf aufmerksam gewesen sind, ob es sich bei den von ihnen angegebenen Normalpersonen um Männer oder Frauen handelte, und Frauen in Menstrual- oder Intermenstrualperiode.

Wir finden bei menstruierenden Frauen Veränderungen in der Serumproteinkonzentration, in Serumcalcium, Serumkalium und Serumnatrium, sowie unter Umständen in der Wasserstoffionenkonzentration des Plasmas, über welche wir später zu berichten hoffen. Wir werden aber schon an dieser Stelle die Tatsache — und Selbstfolge — betonen, daß es *für die Beurteilung eines jeden serologischen* (*und hämotologischen*?) *Befundes bei Frauen absolut notwendig ist, über die zeitlichen Verhältnisse der Untersuchung zu der Menstruation Auskunft zu geben.*

Dies gilt sowohl bei der Untersuchung von physiologischen wie pathologischen Verhältnissen.

Zusammenfassung.

Es wird eine billige, klinisch brauchbare Methode zur Bestimmung der Serumproteine im 0,1 ccm Serum mitgeteilt. Sie beruht auf der Verdünnung des Serums mit Ringerlösung und der Ausführung von *Hellers* Reaktion in einem speziellen Apparat.

Man kann damit Variationen von 0,1 bis 0,7 Proz. in der Serumproteinkonzentration verfolgen.

Die gefundenen Normalwerte sind mit denen mittels der verschiedensten Methoden gefundenen übereinstimmend. Die Normalgrenzen sind 5,55 bis 8,77 Proz., durchschnittlich 7,08 Proz.

Literatur.

1) *Bisgaard*, diese Zeitschr. 58, Heft 1/2, 1913; Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 14, 1913. — 2) *Grahe*, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 24, 1914. — 3) *Brandberg*, zitiert bei *Grahe* und *Bisgaard*. — 4) *Zaloziecki*, Deutsch. Zeitschr. f. Nervenheilk. 47 u. 48, 1913. — 5) *Pfaundler*, zitiert bei *Grahe*. — 6) *Kafka*, Taschenbuch der praktischen Untersuchungsmethoden der Körperflüssigkeiten bei Nerven- und Geisteskrankheiten. Berlin 1917.

Über die Isolierung des Schardingerenzyms aus Milch. Eine Richtigstellung.

Von

F. Gowland Hopkins und **M. Dixon.**

(Aus dem biochemischen Institut der Universität Cambridge.)

(Eingegangen am 23. April 1925.)

In einer Arbeit von *Sbarsky* und *Michlin* (1), die jüngst in dieser Zeitschrift über die Isolierung des Schardingerenzyms aus Milch erschienen ist, erwähnen die Autoren Beobachtungen, die früher von *Dixon* und *Thurlow* (2) gemacht sind. Die Bezugnahme auf diese früher erschienene Arbeit enthält so erhebliche Mißverständnisse, daß eine Berichtigung angebracht erscheint. *Dixon* und *Thurlow* erhielten mit einer Methode, die in erster Linie auf der Fraktionierung mit Ammonsulfat beruht, aus Milch ein Enzympräparat, das befähigt ist, kräftig Aldehyde, Xanthin und Hypoxanthin unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Methylenblau zu oxydieren.

Sbarsky und *Michlin* gewannen ihr Präparat durch Verwendung von Aceton als Fällungsmittel.

Bevor die russischen Autoren ihre eigene Methode beschreiben, führen sie folgendes in bezug auf die Untersuchungen von *Dixon* und *Thurlow* aus: „Es gelang ihnen, das Casein nebst einem Teil des Ferments auszusalzen. Der Fermentgehalt des Niederschlags war aber so gering, daß sie zur Ausführung der Reaktion nicht weniger als 1,5 g Trockenpulvers anwenden mußten (l. c., S. 486)". Diese Angabe entbehrt völlig der Begründung. *Dixon* und *Thurlows* Präparat enthielt — wie klar aus ihrer Beschreibung hervorgeht — die gesamte in der angewandten Milch vorhandene Enzymmenge, und war namentlich so aktiv, daß 1 bis 2 mg des Pulvers genügten, um eine schnelle Entfärbung von Methylenblau in Gegenwart von Aldehyden oder Purinbasen herbeizuführen.

Sbarsky und *Michlin* vermerken (l. c., S. 490), daß die reduzierende Kraft ihres Präparats 240 mal größer war als die der ursprünglichen Milch. Die Feststellungen, auf denen diese Behauptung basiert, lassen

sich allerdings nur schwierig verfolgen, und aus ihren Daten würde sich der Wert 24 als der genauere ergeben. Tatsächlich liefern beide Methoden Präparate von angenähert gleicher Aktivität, und zwar aus dem einfachen Grunde, weil in beiden Fällen mit der Caseinfällung die ganze in der Milch vorhandene Enzymmenge niedergerissen wird. Das Präparat von *Dixon* und *Thurlow* ist in Wasser vollkommen löslich; ferner enthält es weder Peroxydase noch Katalase, was für ein genaueres Studium des Enzyms von Wichtigkeit ist. Das Acetonverfahren führt dagegen zu einem Produkt, das unlöslich in Wasser ist und, wie *Dixon* und *Thurlow* schon gefunden haben, Peroxydase und Katalase einschließt. Somit gewährt die Acetonbehandlung keinen Fortschritt gegenüber der früher beschriebenen Methode, vielmehr nur Nachteile. Die Untersuchung von *Dixon* und *Thurlow* über die Kinetik des Enzyms (3), die übrigens *Sbarsky* und *Michlin* nicht erwähnen, zeigt, welch ausgezeichnete Eigenschaften ihr Präparat besaß.

In bezug auf die früher gemachten Beobachtungen von *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins* (4) wird angegeben, daß beim Studium des Milchenzyms mit der Methylenblaumethode die Autoren 0,00001 ccm Methylenblau pro Kubikzentimeter Lösung angewandt hätten. Tatsächlich sollten es 0,1 ccm sein. Abgesehen von ihrer Methode der Enzymbereitung scheint die Mitteilung von *Sbarsky* und *Michlin* nichts zu enthalten, was nicht bereits von den Cambridger Autoren dargelegt ist. Sie empfehlen die Nitratreduktion an Stelle der Methylenblautechnik; *Dixon* und *Thurlow* machen denselben Hinweis in ihrer Abhandlung.

Literatur.

1) *Sbarsky* und *Michlin*, diese Zeitschr. **155**, 485, 1925. — 2) *Dixon* und *Thurlow*, Biochem. Journ. **18**, 971, 1924. — 3) *Dieselben*, ebendaselbst **18**, 976, 989, 1924. — 4) *Morgan*, *Stewart* und *Hopkins*, Proc. Roy. Soc. London **94**, 109, 1922.

Fortgesetzte Untersuchungen über den Kohlehydratgehalt des Gehirns.

Von

Kiishi Takahashi.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 23. April 1925.)

In einer vor kurzem in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit über experimentelle Kohlehydratverarmung und den Kohlehydratstoffwechsel des Gehirns (Beiträge zur Physiologie der Drüsen von *Leon Asher*, Nr. 70) habe ich nachgewiesen, daß im Gehirn gebundene und freie Kohlehydrate vorkommen, und habe die Bedingungen aufgestellt, unter denen sich das gebundene Kohlehydrat des Gehirns am Stoffwechsel beteiligt. Hiermit war zum ersten Male ein autonomer Kohlehydratstoffwechsel des Gehirns aus seinen Eigenbeständen wahrscheinlich gemacht worden. Das gebundene Kohlehydrat des Gehirns hatte ich in der erwähnten Arbeit als Glykogen bezeichnet, dazu aber gleich einige Reserven gemacht, weil mir der Beweis nicht hinreichend gesichert erschien, daß es sich wirklich um Glykogen handle. Die Gründe hierfür waren die nachfolgenden: Im Anfang meiner Arbeit hatte ich die *Pflüger*sche Methode zur Glykogenbestimmung angewandt und das Glykogen schließlich als Zucker bestimmt. Die *Pflüger*sche Methode arbeitet aber mit siedender konzentrierter Kalilauge, deshalb lag die Möglichkeit vor, daß aus den Hirnlipoiden, in denen Zucker in Form von Galaktose vorkommt, diese abgespalten würde und schließlich als Zucker zur Bestimmung käme. Dies war der Grund, weshalb ich später in meiner Arbeit die neue von *Rona* und *Eweyk*[1]) beschriebene Methode mit heranzog. Ein anderer Grund war der, daß, als ich sowohl nach *Pflügers* wie nach *Ronas* und *Eweyks* Methode Glykogen selbst darstellte, dieses mir in der Löslichkeit sich anders zu verhalten schien als Glykogen aus Lebern und aus Muskeln, und die Jodreaktion in ihrem Farbenton von der Jodreaktion des Leber- und Muskelglykogens abzuweichen schien. Da es von einiger Bedeutung

[1]) Diese Zeitschr. **149**, 174, 1924.

ist, ob wirklich Glykogen im Gehirn vorkommt oder nicht, habe ich auf Anregung von Prof. *Asher* erneut die Frage des Glykogens im Gehirn in Angriff genommen[1]).

Es handelte sich darum, aus dem Gehirn ein Glykogenpräparat durch eine Methode zu gewinnen, welche Gewähr bot, daß man, wenn solches im Gehirn vorkäme, dasselbe erfaßte, vor allem aber, daß das Präparat als Glykogen identifiziert würde.

Das von mir benutzte Verfahren bestand, wie schon gesagt, in einer Modifikation der von *Rona* und *Eweyk* beschriebenen Methode. Das Gehirngewebe wurde mit kaltem Wasser abgespült und in etwa bohnengroße Stücke zerschnitten. Diese Zerkleinerung wurde erst vorgenommen, nachdem die Stücke durch eine Eiskochsalzkältemischung fest durchgefroren waren. Unter Zusatz von Quarzsand wurde die Masse im Mörser fein zerrieben. Sodann wurde der Gewebsquarzsandbrei mit 3proz. Natriumfluoridlösung (etwa 6 ccm pro 10 g Gewebe) eine Zeitlang verrieben, dann 3proz. Trichloressigsäure (10 ccm pro 10 g Gewebe) zugesetzt und gut verrührt. Da ich aus den oben genannten Gründen Kalilauge als auflösendes Agens der das Glykogen einschließenden Zellmasse vermeiden mußte, habe ich auf Rat von Prof. *Asher* Fluornatrium benutzt, dessen zellzerstörende Eigenschaften zuerst *Bottazzi* zu Nutze gezogen hat. In dieser Hinsicht hat sich auch im Berner physiologischen Institut bei früheren Arbeiten Fluornatrium bewährt. Der Trichloressigsäurezusatz diente dazu, um von vornherein das Eiweiß unlöslich zu machen. Nach Zusatz von reichlichem destillierten Wasser wurde abgenutscht. Der Rückstand wurde in den Kolben zurückgebracht und nach Zusatz von Aqua destillata wiederholt stark geschüttelt. Nach kurzer Zeit Stehenlassen wird die überstehende Flüssigkeit abfiltriert. Die zuletzt beschriebenen Manipulationen werden achtmal wiederholt. Das gesamte Filtrat wird schließlich in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad eingedampft.

Nach Abkühlen wird das eingeengte Filtrat durch Kalilauge auf etwa 5 Proz. Alkaleszenz gebracht, sodann mit dem zweimaligen Volumen 95proz. Alkohols versetzt und über Nacht stehengelassen. Während dieser Zeit setzt sich ein weißer, reiner Niederschlag zu Boden. Der Niederschlag wird nach der *Pflüger*schen Methode dreimal mit 60proz., zweimal mit 75proz., einmal mit absolutem Alkohol, sodann zweimal mit Äther und schließlich noch einmal mit absolutem Alkohol gewaschen. Zur quantitativen Bestimmung wurde nach der *Pflüger*schen Methode invertiert.

---

[1]) Der oben genannte Einwand gilt auch hinsichtlich des Befundes von *Schöndorff* (Pflügers Arch. **99**, 191, 1903), dessen Angabe ich leider in meiner ersten Arbeit übersah.

Um den Wert der Methode für quantitative Untersuchungen zu prüfen, habe ich dieselbe an der Leber und dem Muskel angewandt und gleichzeitig Teile des nämlichen Gewebes mit der ursprünglichen *Pflüger*schen Methode und mit meiner neuen Methode untersucht.

Ergebnisse dieser Prüfung bringe ich in der Tabelle I.

Tabelle I.

Datum 1924	Arten des Gewebes	Glykogengehalt		Unterschied zwischen beiden Proz.
		nach *Pflüger*	nach neuer Methode	
12. X.	Froschmuskel	3,19	2,96	7,2
13. X.	„	3,01	3,46	13,0
16. X.	Froschleber	34,48	36,59	5,8
18. X.	„	28,43	29,27	2,2
19. X.	„	20,70	27,64	7,7

Die gefundenen Unterschiede betragen zwischen 2,2 und 13 Proz., demnach darf man beide Methoden, was Leber und Muskel anbetrifft, als angenähert gleichwertig erachten. Nachdem ich mich von der Brauchbarkeit der Methode überzeugt habe, habe ich sie an Gehirnen von Kaninchen zu quantitativen Glykogenbestimmungen gebraucht. Das Ergebnis an drei Kaninchengehirnen gibt die Tabelle II.

Tabelle II.

Datum 1924	Gehalt mg pro 1 g Gewebe an reduzierender Substanz
20. X.	0,14
22. X.	0,19
27 X.	0,15

Die hier gefundenen Werte sind kleiner als ich sie früher in meiner vorausgegangenen Arbeit mitgeteilt habe, denn durchschnittlich sind die jetzt ermittelten Werte zwischen einem Drittel und der Hälfte der früheren. Ich hatte damals darauf aufmerksam gemacht, daß möglicherweise nicht alles, was als Glykogen bewertet wurde, wirklich Glykogen war.

Ich habe mich noch einer weiteren Methode bedient, nämlich einer Modifikation der *Pflüger*schen Methode. Im Anfang wurde das Gehirn ganz gleich behandelt wie es die *Pflüger*sche Methode für Leber und Muskel vorschreibt. Der nach der *Pflüger*schen Methode durch Fällung schließlich erhaltene Niederschlag wurde vollständig getrocknet. Die getrocknete Substanz wurde mit wenig kaltem Wasser aufgelöst und filtriert. Der Niederschlag auf dem Filter wurde mehrfach mit kaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wird mit dem zweifachen Volumen 95proz. Alkohols versetzt und über Nacht stehengelassen. Der feinflockige Niederschlag wird mit 60proz., 95proz., absolutem Alkohol

sowie mit Äther gewaschen, sodann nach *Pflüger* invertiert. Das Ergebnis der Untersuchung von drei Kaninchengehirnen mit dieser etwas modifizierten *Pflüger*schen Methode gebe ich in Tabelle III.

Tabelle III.

Datum 1924	Gehalt mg pro 1 g Gehirn an reduzierender Substanz
31. X.	0,28
4. XI.	0,18
6. XI.	0,22

Die Werte sind um ein klein wenig größer als diejenigen mit der soeben mitgeteilten Methode.

Ich hatte noch Gelegenheit, zwei menschliche Gehirne auf ihren Glykogengehalt zu untersuchen. Das eine Gehirn stammte von einem Tetanusfall, der unter schweren tetanischen Krämpfen gestorben war, das andere Gehirn stammte von einem unkomplizierten Fall von Lungentuberkulose, der keinerlei Gehirnerscheinungen gezeigt hatte. Beide Fälle kamen 15 Stunden nach dem Tode zur Sektion, die Gehirne wurden sofort in Eis verpackt und mir zur Verarbeitung zugeschickt. Man wird sich natürlich von vornherein sagen, daß selbst, wenn im Gehirn Glykogen vorhanden sein sollte, man nicht erwarten darf, den wahren Wert zu erhalten. Aber immerhin schien mir der Vergleich einiges Interesse zu bieten, da ich in meiner früheren Arbeit gefunden habe, daß einzig zentral bedingte Krämpfe die gebundenen Kohlehydrate des Gehirns zu vermindern vermochten.

Je 20 g der beiden Gehirne habe ich nach *Pflüger* und 100 g mit Hilfe meiner neuen Methode bestimmt. Die *Pflüger*sche Methode ergab in dem Gehirn, das von dem Tetanusfall stammte, pro Gramm 0,37 mg, in dem anderen Gehirn aber 1,01 mg pro Gramm Gehirn. Mit meiner neuen Methode fand ich in dem Tetanusgehirn nur 0,01 mg pro Gramm Gehirn, während ich in dem anderen Gehirn 0,09 mg pro Gramm fand. Ich halte die kleineren Werte mit der neuen Methode für die richtigeren. Diese rein orientierenden Versuche zeigen jedenfalls, daß nach einem voraufgehenden Tetanus im Gehirn minimale Werte des gebundenen Kohlehydrats gefunden werden.

Die bisher mitgeteilten Versuche können natürlich nicht darüber entscheiden, ob im Gehirn wirklich Glykogen vorkommt. Hierzu bedurfte es der präparativen Darstellung des Glykogens und der Anstellung von Glykogenreaktionen mit dem erhaltenen Präparat. Ich habe von allen Gehirnen, die ich zu quantitativen Versuchen brauchte, sowie auch von einigen nur zur Anstellung der qualitativen Reaktionen dienenden Gehirnen versucht, möglichst reine Glykogenpräparate zu gewinnen, um mit diesen die Jodjodkaliumreaktion anzustellen. Alle

präparativen Versuche wurden mit meiner neuen Methode angestellt. Es zeigte sich, daß es sehr schwer war, aus dem Gehirn ein einigermaßen reines Präparat zu gewinnen. Besonders auffallend war der nicht kleine Aschengehalt der Präparate. Unter anderem ließ sich sehr leicht Eisen nachweisen. Aber je mehr es gelang, die Präparate zu reinigen, um so deutlicher wurde in allen Fällen die Glykogenreaktion mit Jodjodkaliumlösung. Der Farbenton war derjenige, welcher vom Muskelglykogen erhalten wird, ein Ton, der ja etwas anders ist als der Ton bei dem Leberglykogen. Beim Erwärmen verschwand die violettrote Farbe, um beim Abkühlen wiederzukehren. Ich komme auf Grund meiner qualitativen Untersuchungen zu dem Schlusse, daß der mit Hilfe meiner neuen Methode aus dem Gehirn dargestellte Stoff tatsächlich Glykogen sei.

Bei der Wichtigkeit der Frage, ob Glykogen im Gehirn vorkomme, haben wir geglaubt, ein Präparat der Autorität von Herrn Prof. *Karrer* in Zürich unterbreiten zu sollen. Ich habe daher kurz ehe ich aus äußeren Gründen meine Untersuchungen abbrechen mußte, ein neues Präparat aus Kaninchengehirn dargestellt und Herrn Prof. *Karrer* eingeschickt. Herr Prof. *Karrer* hatte die große Güte, wofür ich ihm nochmals herzlich danke, folgenden Bericht an Prof. *Asher* einzusenden.

„0,292 g enthielten eine Kohlehydratmenge, die 75 mg Glucose gab. Andererseits zeigten diese 0,292 g in 20,0 g wässeriger Lösung eine Drehung von $+ 0{,}315^0$ ($l = 0{,}5$ dm). Da die durch Hydrolyse gefundenen 75 mg Glucose 67,5 mg Glykogen entsprechen würden, so käme diesen 67,5 mg Ihres Kohlehydrats die spezifische Drehung von $+ 188^0$ zu:

$$\left([\alpha] = \frac{+\,0{,}315\,.\,20{,}0}{0{,}5\,.\,1\,.\,0{,}0675} = 186^0\right)$$

Dieser Wert kommt also recht nahe an die spezifische Drehung von reinem Glykogen heran.

Die Jodreaktion Ihres Kohlehydrats geht ziemlich stark ins Violettrote, aber gerade beim Muskelglykogen ist die Farbe allgemein viel rotstichiger als beim Leberglykogen. Ich glaube daher, daß das gesamte Kohlehydrat, soweit man darüber im vorliegenden Reinheitszustand urteilen kann, in seinen Eigenschaften dem Glykogen sehr nahe kommt, so daß es mit ihm wohl identisch oder sehr nahe verwandt sein muß."

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, daß im Gehirn Glykogen vorkommt. Damit gewinnen die in meiner vorausgegangenen Arbeit mitgeteilten Befunde eine erhöhte biologische Bedeutung und eröffnen sich neue Möglichkeiten der Untersuchung des Kohlehydratstoffwechsels des Zentralnervensystems.

Eine Mikromethode zur Bestimmung der Chloride in Körperflüssigkeiten.

Von

Alfred Nitschke.

(Aus der medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Altona a. d. Elbe.)

(Eingegangen am 24. April 1925.)

Die Methode benutzt das *Bangsche* Prinzip der Alkoholextraktion der Chloride mit nachfolgender Titration mit Silbernitrat, vermeidet aber die Wägung und die lange Extraktionsdauer.

Der Gang der Bestimmung ist folgender: Man bringt in ein unten breites Zentrifugengläschen 0,3 ccm destillierten Wassers, saugt dann mit einer geeichten Pipette 0,1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit auf, bläst diese langsam nach sorgfältiger Reinigung der Pipettenspitze in das Zentrifugenglas ein und spült die Pipette zweimal mit etwa 0,1 ccm destillierten Wassers nach.

Bei der Bestimmung im Serum fügt man kubikzentimeterweise 6 ccm absoluten Alkohols zu, indem man jedesmal kräftig umschüttelt.

Zur Analyse im Gesamtblut läßt man das Blut zunächst hämolysieren und bläst dann, bevor Gerinnung eintritt, die die vollkommene Extraktion verhindert, 6 ccm absoluten Alkohols kräftig am Rande des Zentrifugenglases ein und schüttelt durch. Hierbei tritt eine feinflockige Ausfällung der Eiweißkörper ein, und die Chloride finden sich quantitativ im Alkohol.

Es wird jetzt 3 bis 5 Minuten zentrifugiert, der überstehenden klaren Lösung wird im gleichen Zentrifugenglas ein Tropfen Kaliumchromat als Indikator zugesetzt und mit n/100 Silbernitrat bis zur Braunfärbung titriert.

Die verbrauchten Kubikzentimeter Silbernitrat ergeben mit 0,355 multipliziert den prozentualen Chlor-, mit 0,585 den prozentualen Kochsalzgehalt der untersuchten Flüssigkeit.

Der Wert einer Leerbestimmung wird hierbei nicht abgezogen, wie dies *Bang* angibt, da schon der Zusatz von 0,5 ccm destillierten Wassers zu 6 ccm absolutem Alkohol einen deutlichen Umschlag bei 1 Tropfen Silbernitrat eintreten läßt.

Im folgenden sind Vergleiche zwischen Mikromethode (Mittelwert aus zwei Parallelbestimmungen) und Makromethode (Uranylacetatfällung, Titration mit n/10 Silbernitrat) angegeben:

Mikromethode Proz. Cl	Makromethode Proz. Cl	Mikromethode Proz. Cl	Makromethode Proz. Cl
0,382	0,383	0,378	0,376
0,383	0,383	0,347	0,347
0,380	0,383	0,358	0,358
0,385	0,383	0,422	0,422

Es folgen einige Werte, in denen zum Serum- oder Gesamtblut (Citratblut) analytisch gewogene Kochsalzmengen zugesetzt und Ausgangs- und Endwert mit der Mikromethode bestimmt wurde.

Serum Ausgangswert Proz. NaCl	Errechnet	Gefunden	Gesamtblut Ausgangswert Proz. NaCl	Errechnet	Gefunden
0,632	1,03	1,03	0,612	1,21	1,20
0,596	0,896	0,892	0,514	0,714	0,714
0,674	1,07	1,06	0,556	0,956	0,959
0,634	1,03	1,02			

Die gefundene maximale Fehlergrenze der Methode beträgt also $\pm$ 1 Proz.

Die serologische Differenzierung von Lecithin und Cholesterin.

Von

H. Sachs und A. Klopstock.

(Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg.)

(Eingegangen am 26. April 1925.)

Durch die Untersuchungen von *Sachs*, *Klopstock* und *Weil*[1]) ist gezeigt worden, daß es durch Vorbehandlung von Kaninchen mit arteigenen Organextrakten bzw. mit Lipoidfraktionen in Verbindung mit geeignetem, artfremdem Serum (Schweineserum) möglich ist, reaktive Veränderungen im Blutserum zu erzeugen, die es befähigen, beim Zusammenwirken mit den entsprechenden Extrakten bzw. Lipoiden, Komplementbindung und Ausflockung zu ergeben, und dadurch als die Folge einer Antikörperbildung imponieren. Das Eigenartige des Vorganges ist darin zu erblicken, daß, entsprechend früheren Beobachtungen *Landsteiners* bei der Immunisierung mit heterogenetischen Lipoiden, nicht die Lipoide an und für sich zur Antikörperbildung führen, sondern erst im Verein mit der artfremden Serumkomponente ihre Antigenfunktionen erkennen lassen. Derart ist es gelungen, experimentell ohne Verwendung syphilitischen Materials jene Blutveränderung zu erzielen, die beim Menschen für Syphilis charakteristisch ist, und so die von *Weil* und *Braun*, später von *Wassermann* und anderen vertretene Auffassung, daß die zur Serodiagnostik der Syphilis dienenden Reaktionen durch Antikörper gegen körpereigene Gewebszerfallsprodukte lipoider Art bedingt sind, mit der Sicherheit des Experiments als richtig zu erweisen.

Von besonderem biologischen Interesse mußte nun die Frage erscheinen, *ob es mit Hilfe von Antiseris, die derart durch kombinierte Vorbehandlung mit Lipoidfraktionen und Schweineserum gewonnen sind, möglich ist, die einzelnen Lipoide im Reagenzglas biologisch zu unterscheiden.* Wir haben in dieser Richtung bisher dreierlei Antiserumtypen hergestellt:

---

[1]) *H. Sachs, A. Klopstock* und *A. J. Weil*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 15.

1. *durch Vorbehandlung mit dem Merckschen Lecithinpräparat;*

2. mit einem *Lecithinpräparat*, das uns durch die chemische Fabrik C. H. Böhringer Sohn in Niederingelheim früher freundlichst zur Verfügung gestellt war. Es soll sich nach den Angaben der Herstellungsstätte von den übrigen Handelspräparaten dadurch unterscheiden, daß es von Fetten und Cholesterin weitgehend befreit ist;

3. *durch Vorbehandlung mit Cholesterin von Kahlbaum.*

Die Untersuchungen, über die wir zu berichten uns erlauben[1]), sollten zunächst entscheiden, ob ein Lecithin-Antiserum auch auf Cholesterin wirkt und umgekehrt. Von vornherein war zu erwarten, daß das mit Lecithin-*Merck* hergestellte Antiserum auch auf Cholesterin wirken würde, während von dem Lecithin-*Böhringer*-Antiserum ein derartiges Übergreifen, wofern es frei von Cholesterin ist, nicht anzunehmen war.

Zu unseren Versuchen diente im wesentlichen die Komplementbindungsmethode, daneben wurde auch die Ausflockungsreaktion herangezogen. Für das Arbeiten mit Cholesterin wurde die von *Klopstock*[2]) im Anschluß an die Beobachtungen von *Keeser*[3]) angegebene Methode benutzt, indem zu 5 Teilen kochenden, destillierten Wassers 1 Teil einer 1proz. alkoholischen Cholesterinlösung tropfenweise zugegeben wurde. Die so bereitete Emulsion wurde heiß filtriert und konnte dann, dank ihrer Stabilität, zu den Versuchen dienen, wobei der erforderliche isotonische Salzgehalt durch Verdünnen des Serums mit Kochsalzlösung entsprechend höherer Konzentration erreicht wurde.

Die zu unseren Versuchen dienenden Antisera waren folgende:

1. Lecithin-Merck-Antiserum 144,

gewonnen von Kaninchen durch intravenöse Injektion des Rückstandes von je 4 ccm 1proz. alkoholischer Lecithinlösung, der in 5 ccm zehnfach verdünnten aktiven Schweineserums aufgenommen wurde. Die Gemische wurden nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur in Abständen von 3 Tagen intravenös injiziert. 7 Tage nach der fünften Injektion wurde das Tier durch Entbluten getötet und das Antiserum gewonnen.

2. Lecithin-Böhringer-Antiserum 163.

Die Injektionsgemische wurden in der gleichen Weise wie bei dem Lecithin-*Merck*-Antiserum bereitet. Die intravenöse Injektion erfolgte in dreitägigen Abständen siebenmal. Das Antiserum wurde 2 Tage nach der letzten Injektion gewonnen.

---

[1]) Bei Ausführung der Versuche wurden wir von Fräulein *Christfriede Springborn* unterstützt.

[2]) *A. Klopstock*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 21.

[3]) *Keeser*, diese Zeitschr. 154, 321. 1924.

3. Cholesterin-Antiserum 149.

Zu 9 ccm siedenden destillierten Wassers wurden 2 ccm 1 proz. alkoholischer Cholesterinlösung zugefügt. Die Emulsion wurde heiß filtriert. Zu dem Filtrat wurde ein Gemisch von 0,5 ccm aktiven Schweineserums und 0,9 ccm 10 proz. Kochsalzlösung zugesetzt. Von dieser Mischung wurden 10 ccm intravenös injiziert. Die Injektionen erfolgten in Abständen von 3 Tagen. Das Antiserum wurde 8 Tage nach der siebenten Injektion gewonnen.

Zu den Immunisierungsversuchen ist zu bemerken, daß *Kontrollen mit getrennter Injektion der beiden Komponenten stets ein negatives Ergebnis zeitigten.* Im übrigen gelang die Bildung von Antikörpern am leichtesten mit dem *Merck*schen Lecithinpräparate. Bei Verwendung von Lecithin-*Böhringer* war in der Regel eine größere Zahl von Injektionen erforderlich. Am schwierigsten und unter nicht unerheblichen quantitativen Variationen schien die Antikörperbildung bei Vorbehandlung mit Cholesterin zu erfolgen. Auch übten die Cholesterininjektionen nicht selten schockartige Nebenwirkungen aus, so daß bei dieser Vorbehandlung unter Umständen mit Tierverlusten zu rechnen ist.

Was nun *die Wirksamkeit der Antisera* anlangt, so lassen wir zunächst ein Versuchsbeispiel folgen, das die komplementbindende Funktion des Lecithin-*Merck*-Antiserums gegenüber Lecithin und Cholesterin zeigt.

Absteigende Mengen des Lecithin-*Merck*-Antiserums 144 (Volumen 0,25 ccm) wurden:

a) mit je 0,25 ccm $^1/_{30}$proz. Lecithin-*Merck*,

b) mit je 0,25 ccm $^1/_{30}$proz. Lecithin-*Böhringer*,

c) mit je 0,25 ccm $^1/_{50}$proz. Cholesterin

1 Stunde im Eisschrank[1]) unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Meerschweinchenserums digeriert.

Zur Herstellung der Lipoidlösungen ist zu bemerken, daß die Lecithinlösung durch 30fache Verdünnung 1 proz. alkoholischer Stammlösung derart gewonnen wurde, daß zunächst gleiche Teile der Stammlösung und physiologischer Kochsalzlösung gemischt und nach einem Intervall von 10 bis 15 Sekunden 28 Teile physiologischer Kochsalzlösung zugefügt wurden.

Die Verdünnungen der Cholesterinlösung sind nach dem schon erwähnten Vorgang von *Klopstock* mit destilliertem Wasser bereitet. Dementsprechend wurde in der Versuchsreihe c die Meerschweinchenserumverdünnung mit höher konzentrierter Kochsalzlösung bereitet.

---

[1]) Die Komplementbindungsversuche wurden bei niedriger Temperatur vorgenommen, weil, wie schon früher mitgeteilt wurde, bei höherer Temperatur nichtspezifische Komplementbindungsphänomene mit Cholesterin interferieren, die augenscheinlich auf Funktionen der Kolloidlabilität zurückzuführen sind. Durch die Benutzung der niedrigeren Temperatur kommt aber die Reaktionsfähigkeit der Lecithin-Antisera in den Tabellen I bis III schwächer zum Ausdruck, als es bei höherer Temperatur der Fall wäre.

Nach dem Digerieren der Gemische erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Amboceptorverdünnung.

Die im Brutschrank eingetretene Hämolyse ist aus Tabelle I ersichtlich[1]).

Tabelle I.

Mengen des Lecithin-*Merk*-Antiserums 144	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Zusammenwirken des letzteren mit Lecithin-*Merck*-Antiserum und		
ccm	a Lecithin-*Merck*	b Lecithin-*Böhringer*	c Cholesterin
0,025	0	0	0
0,015	0	0	0
0,01	0	0	0
0,005	0	m.	0
0,003	0	st.	0
0,002	m.	c.	w.
0,001	c.	c.	c.

Wie die Tabelle I zeigt, *übt das Lecithin-Merck-Antiserum nicht nur gegenüber Lecithin, sondern auch gegenüber Cholesterin eine erhebliche Komplementbindung aus.* An und für sich erlaubt der Versuch daher kaum die Frage zu entscheiden, ob es sich hier um Gemeinsamkeiten etwa physikochemischer Art, die zwischen Cholesterin und Lecithin bestehen, handelt, oder ob das Übergreifen durch einen Cholesteringehalt des *Merck*schen Lecithinpräparats bedingt ist, der gleichzeitig zur Entstehung von Antikörpern gegen Cholesterin führt. Ein Cholesteringehalt des *Merck*schen Präparats könnte auch dafür verantwortlich zu machen sein, daß das Antiserum auf Lecithin-*Merck* nicht unerheblich stärker wirkt als auf Lecithin-*Böhringer*. Wir wissen ja schon aus der Praxis der Serodiagnostik der Syphilis, daß ein Cholesterinzusatz zu den Extrakten ihre Reaktionsfähigkeit bei der Komplementbindung erheblich zu verstärken geeignet ist, und die Gesamtheit der Erfahrungen dürfte dafür sprechen, daß es sich hierbei um eine bessere physikochemische Eignung der Lipoidsuspensionen für die Komplementbindung handelt, die durch einen Cholesterinzusatz bedingt ist.

Trotz der Antikörpernatur der bei den serologischen Luesreaktionen interferierenden Serumstoffe wird man daher nach wie vor zu berücksichtigen haben, daß für die Antigenfunktion der Lipoide in vitro ihr

[1]) In den Tabellen bedeuten: c. = komplette Hämolyse, fc. = fast komplette Hämolyse, st. = starke Hämolyse, m. = mäßige Hämolyse, w. = wenig Hämolyse, Sp. = Spur Hämolyse, Spch. = Spürchen Hämolyse, 0 = keine Hämolyse.

physikochemischer Charakter eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Dafür spricht schon die Abhängigkeit der Extraktwirkung von der Art der Verdünnung bzw. von der Art der Suspension, ein Faktor, der nicht nur für die Serodiagnostik der Syphilis, sondern, wie erst jüngst Erfahrungen von *Dölter*[1]) aus dem hiesigen Institut gezeigt haben, auch für die heterogenetische Antikörperreaktion von größter Bedeutung ist. Der Unterschied im kolloidchemischen Charakter der beiden Lecithinpräparate, mag er nun durch Anwesenheit bzw. Fehlen von Cholesterin oder durch andere Ursachen bedingt sein, äußert sich übrigens auch darin, daß das Lecithinpräparat von *Böhringer* nach unseren bisherigen Versuchen kaum oder schwer zu Flockungsreaktionen geeignet ist, während die Herstellung ausflockbarer Lipoidemulsionen mit dem *Merck*schen Lecithinpräparat ohne weiteres gelingt.

Daß in der Tat derartige sekundäre Momente für das verschiedene Verhalten der beiden Lecithinpräparate verantwortlich zu machen sein dürften, dafür spricht auch der Umstand, daß das durch Vorbehandlung mit Lecithin-*Böhringer* hergestellte Antiserum gleichfalls mit dem *Merck*schen Lecithinpräparat stärker reagiert, wie es folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Absteigende Mengen Lecithin-*Böhringer*-Antiserums 163 (Volumen 0,25) wurden:

a) mit je 0,25 ccm $^{1}/_{30}$proz. Lecithin-*Merck*,
b) mit je 0,25 ccm $^{1}/_{30}$proz. Lecithin-*Böhringer*,
c) mit je 0,25 ccm $^{1}/_{60}$proz. Cholesterin

unter Zusatz von 0,25 ccm zehnfach verdünnten Meerschweinchenserums 1 Stunde im Eisschrank digeriert. Die Versuchsanordnung entspricht im übrigen derjenigen von Tabelle I. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Amboceptorverdünnung.

Das Ergebnis ist aus Tabelle II ersichtlich:

Tabelle II.

Mengen Lecithin-*Böhringer*-Antiserums	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Lecithin-*Böhringer*-Antiserum und		
	a	b	c
ccm	Lecithin-*Merck*	Lecithin-*Böhringer*	Cholesterin
0,025	0	0	c.
0,015	0	0	c.
0,01	0	0	c.
0,005	0	st.	c.
0,003	m.	c.	c.
0,002	c.	c.	c.

[1]) *W. Dölter*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **43**, 95, 1925.

Es ergibt sich also, *daß das durch Vorbehandlung mit Lecithin-Böhringer gewonnene Antiserum mit Lecithin-Merck stärker als mit Lecithin-Böhringer reagiert.* Bemerkenswert ist der Umstand, *daß eine Reaktionsfähigkeit des Lecithin-Böhringer-Antiserums mit Cholesterin fehlt,* bzw. in anderen Versuchen nur in so gering angedeutetem Grade vorhanden war, daß man kaum versucht sein wird, hier von einer spezifischen Antikörperwirkung zu sprechen.

Die Differenzierung, die sich mit dem Lecithin-*Böhringer*-Antiserum gegenüber Cholesterin im Gegensatz zu dem Verhalten des Lecithin-*Merck*-Antiserums ergibt, wird um so beweiskräftiger, wenn man hiermit das Verhalten des Cholesterin-Antiserums vergleicht, wie es sich aus folgendem Versuchsbeispiel ergibt.

Absteigende Mengen des Cholesterin-Antiserums 149 (Volumen 0,25 ccm) wurden:

a) mit je 0,25 ccm $^1/_{30}$proz. Lecithin-*Merck*,

b) mit je 0,25 ccm $^1/_{30}$proz. Lecithin-*Böhringer*,

c) mit je 0,25 ccm $^1/_{50}$proz. Cholesterin

unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Meerschweinchenserums 1 Stunde im Eisschrank digeriert. Die Versuchsanordnung entspricht im übrigen derjenigen von Tabelle I und II. Es erfolgte sodann Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Amboceptorverdünnung.

Die eingetretene Hämolyse ist aus Tabelle III ersichtlich:

Tabelle III.

Mengen des Cholesterin-Antiserums	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Cholesterin-Antiserum und		
	a Lecithin-*Merck*	b Lecithin-*Böhringer*	c Cholesterin
ccm			
0,025	c.	c.	0
0,015	c.	c.	0
0,01	c.	c.	0
0,005	c.	c.	0
0,003	c.	c.	0
0,002	c.	c.	0
0,001	c.	c.	w.
0,0006	c.	c.	c.

Das Versuchsbeispiel zeigt, *daß das Cholesterinantiserum lediglich mit Cholesterin reagiert,* dagegen mit den beiden Lecithinpräparaten unter den vorliegenden Bedingungen keine Komplementbindung ergibt. Es besteht also beim Vergleich mit dem Lecithin-*Böhringer*-Antiserum (Tabelle II) eine direkte Inversion des Versuchsergebnisses. *Das Lecithin-Antiserum reagiert nur mit Lecithin, das Cholesterin-Antiserum nur mit Cholesterin.*

Nicht ohne weiteres so durchsichtig liegen die Verhältnisse bei einem Vergleich mit dem Lecithin-*Merck*-Antiserum (vergl. Tabelle I). Das letztere reagiert mit Cholesterin annähernd bis zu den gleichen Mengen wie mit Lecithin-*Merck*. In bezug auf das *Böhringer*sche Lecithinpräparat wird sogar die Komplementbindung durch diejenige mit Cholesterin übertroffen. Aber auch hier ergibt sich ein scharfer Gegensatz zu dem Verhalten des Cholesterin-Antiserums, das mit Cholesterin stärker als das Lecithin-*Merck*-Antiserum reagiert, dagegen mit Lecithin zu keiner Komplementbindung führt.

Man wird wohl zunächst die Schlußfolgerung ziehen dürfen, daß das Lecithin-*Merck*-Antiserum zugleich Antikörper gegen Cholesterin enthält, entsprechend einem Cholesteringehalt des zur Vorbehandlung benutzten Präparats. Andererseits ist anzunehmen, daß die Cholesterin-Antikörper zu keiner Verstärkung der Komplementbindung mit dem *Merck*schen Lecithinpräparat führen, da ja das Cholesterin-Antiserum mit Lecithin überhaupt nicht reagiert. Wenn daher das Lecithin-*Merck*-Antiserum und ebenso das Lecithin-*Böhringer*-Antiserum mit Lecithin-*Merck* stärkere Komplementbindung ergeben als mit Lecithin-*Böhringer*, so wird man wohl die bessere physikochemische Eignung des ersteren hierfür verantwortlich machen können, wobei dahingestellt bleiben muß, ob der Cholesteringehalt des *Merck*schen Präparats oder andere Momente für die günstigere kolloidchemische Beschaffenheit verantwortlich zu machen sind.

Auffällig ist, daß das Cholesterin-Antiserum mit Lecithin-*Merck* überhaupt nicht reagiert, obwohl durch Vorbehandlung der Kaninchen mit diesem Lecithinpräparat Antisera erzeugt werden, die mit Cholesterin Komplementbindung ergeben. Man kann zur Erklärung annehmen, daß der Cholesteringehalt des *Merck*schen Lecithins zwar genügt, um Antikörper zu erzeugen, aber nicht, um im Reagenzglas mit dem Antiserum zu reagieren. Dann aber wäre in Betracht zu ziehen, daß das Cholesterin durch das Lecithin seiner unmittelbaren Reaktionsfähigkeit in vitro entzogen werden könnte. Für den letzteren Umstand scheinen uns Versuche zu sprechen, in denen einerseits bei geeigneter Anordnung eine geringe Reaktionsfähigkeit des Cholesterin-Antiserums mit *Merck*schem Lecithin nachzuweisen war, während sie bei Verwendung mit Lecithin-*Böhringer* immer ausblieb, und in denen andererseits beim direkten Mischen von Cholesterin und Lecithin die Funktion des ersteren hochgradig zu verschwinden schien.

In ersterer Hinsicht lassen wir ein Versuchsbeispiel folgen, das die Abhängigkeit der Reaktionsfähigkeit des Cholesterin-Antiserums gegenüber *Merck*schem Lecithin von den quantitativen Verhältnissen demonstriert.

Es wurde eine 1 proz. Emulsion von Lecithin-*Merck* derart gewonnen, daß eine 1 proz. alkoholische Lösung verdampft und der Rückstand in gleichem Volumen physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde.

Absteigende Mengen dieser 1 proz. Emulsion wurden:

a) unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Lecithin-*Merck*-Antiserums,

b) unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Cholesterin-Antiserums

mit je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Meerschweinchenserums 1 Stunde im Brutschrank digeriert. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Amboceptorverdünnung.

Die nach 20 Minuten (α) und nach 1 Stunde (β) abgelesene Hämolyse ist aus Tabelle IV ersichtlich:

Tabelle IV.

Mengen von 1 proz. Lecithin	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Lecithin-*Merck* und			
	a Lecithin-*Merck*-Antiserum nach		b Cholesterin-Antiserum nach	
ccm	α 20 Min.	β 1 Std.	α 20 Min.	β 1 Std.
0,25	0	Spch.	c.	c.
0,15	0	Spch.	c.	c.
0,1	0	Spch.	c.	c.
0,05	0	0	st.	c.
0,03	0	0	m.	c.
0,02	0	0	m.	c.
0,01	0	0	Spch.	c.
0,006	0	0	Spch.	c.
0,004	0	0	0	m.
0,002	0	0	m.	c.
0,0008	0	m.	c.	c.
0	c.	c.	c.	c.

Aus dem Versuchsbeispiel, das sich nicht immer mit gleicher Prägnanz reproduzieren ließ, ergibt sich, *daß hier die Reaktionsfähigkeit des Cholesterin-Antiserums mit dem Lecithin-Merck in ausgesprochener Weise von der Dosierung abhängt und schon ein geringer Überschuß des Lecithinpräparats die Komplementbindung verhindert. Es sei erwähnt, daß in gleichsinnigen Parallelversuchen mit dem Böhringerschen Lecithinpräparat keinerlei Komplementbindung zu erzeugen war.*

Für die Larvierung der Cholesterinfunktion durch Zusatz von Lecithin spricht auch folgender Versuch, in dem Lecithin und Cholesterin gemischt wurden.

Absteigende Mengen der verschiedenen Antisera (Volumen 0,25 ccm) wurden:

in den Reihen I mit je 0,25 ccm 1/50 proz. Cholesterins (nach dem Vorgang von *Klopstock* bereitet),

in den Reihen II mit je 0,25 ccm einer 15fachen Verdünnung eines gleichteiligen Gemischs 1proz. alkoholischer Lösung von Lecithin-*Merck* und Cholesterin,

in den Reihen III mit je 0,25 ccm einer 15fachen Verdünnung eines gleichteiligen Gemisches 1proz. alkoholischer Lösung von Lecithin-*Böhringer* und Cholesterin

unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Meerschweinchenserums 1 Stunde im Eisschrank digeriert. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Amboceptorverdünnung und Hammelblutaufschwemmung.

Das Ergebnis zeigt Tabelle V.

Tabelle V.

Mengen des Antiserums	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit								
	I. Cholesterin und *)			II. Lecithin-*Merck*-Cholesterin und *)			III. Lecithin-*Böhringer*-Cholesterin und *)		
ccm	Lec.-*M.*-A. S.	Chol.-A. S.	Lec.-*B.*-A. S.	Lec.-*M.*-A. S.	Chol.-A. S.	Lec.-*B.*-A. S.	Lec.-*M.*-A. S.	Chol.-A. S.	Lec.-*B.*-A. S.
0,025	0	0	c.	0	Spch.	0	0	c.	0
0,015	0	0	c.	0	m.	0	0	c.	0
0,01	0	0	c.	0	c.	0	0	c.	0
0,005	0	0	c.	0	c.	0	0	c.	0
0,003	0	0	c.	0	c.	0	0	c.	w.
0,002	Sp.	0	c.	0	c.	0	0	c.	c.
0,001	fc.	st.	c.	fc.	c.	c.	fc.	c.	c.
0,0006	c.	c.	c.	c.	c.	c.	c.	c.	c.

*) Lec.-*M.*-A. S. = Lecithin-*Merck*-Antiserum, Chol.-A. S. = Cholesterin-Antiserum, Lec.-*B.*-A. S. = Lecithin-*Böhringer*-Antiserum.

Aus der Tabelle V ergibt sich zunächst in Bestätigung der früheren Versuche, daß, wie Teil I zeigt, Cholesterin nur mit dem Cholesterin-Antiserum und dem Lecithin-*Merck*-Antiserum reagiert, dagegen mit dem Lecithin-*Böhringer*-Antiserum keinerlei Reaktion ergibt. Obwohl nun in den Teilen II und III der Tabelle V der Cholesteringehalt denjenigen in Teil I übertrifft ($^1/_{30}$proz. Cholesterin gegenüber $^1/_{50}$proz. Cholesterin), erscheint *hier durch den Lecithinzusatz die komplementbindende Funktion des Cholesterins aufgehoben bzw. ganz erheblich reduziert.* Bei der Mischung des Cholesterins mit Lecithin-*Böhringer* bewirkt das Cholesterin-Antiserum überhaupt keine Komplementbindung. Beim Zusammenwirken von Cholesterin mit Lecithin-*Merck* tritt nur unter Verwendung der größten Dosen des Cholesterin-Antiserums eine partielle Hemmung der Hämolyse auf, während sie unter einfacher Berücksichtigung des Cholesteringehalts stärker sein müßte als in Teil I der Tabelle V. Man wird aus diesen Ergebnissen also schließen dürfen, *daß in der Tat durch den Lecithinzusatz die komplementbindende*

Funktion des Cholesterins eine erhebliche Abschwächung oder Aufhebung erfährt.

Zu berücksichtigen bleibt allerdings der Umstand, daß das Cholesterin an und für sich in Teil I der Tabelle V auch in anderer physikochemischer Struktur an der Reaktion teilnehmen könnte wie in den Teilen II und III, in denen durch den Lecithinzusatz die kolloidchemischen Eigenschaften wohl verändert sein dürften. Jedenfalls aber dürfte sich aus diesen Befunden der scheinbare Widerspruch erklären, daß das Cholesterin-Antiserum mit Lecithin-*Merck* keine Komplementbindung ergibt, obwohl dieses Präparat gleichzeitig mit den Lecithin-Antikörpern Cholesterin-Antikörper zu erzeugen befähigt ist. Ganz einwandfrei liegen demgegenüber die mitgeteilten Bedingungen beim Vergleich des Cholesterins mit dem Lecithinpräparat von *Böhringer*. Hier ist augenscheinlich, sowohl in bezug auf die Vorbehandlung als auch in bezug auf die Wirkung der Antisera, eine scharfe Differenzierung vorhanden.

Was nun die *Empfindlichkeit der hier beschriebenen Antiserumwirkungen* in bezug auf die Lipoide anlangt, so ergibt sich bereits aus Tabelle IV, daß mit dem Lecithin-Antiserum noch mindestens $^1/_{100}$ mg Lecithin als solches nachgewiesen werden kann, und man wird nicht fehlgehen in der Annahme — einige unserer Versuche sprechen dafür —, daß sich durch geeignete Versuchsbedingungen die Schärfe der Reaktion noch steigern läßt. Für den Nachweis des Cholesterins dürften ähnliche quantitative Bedingungen gelten, wie sich aus folgendem Versuchsbeispiel ergibt:

Absteigende Mengen $^1/_{[illegible]}$proz. Cholesterinemulsion in destilliertem Wasser (nach dem Vorgang von *Klopstock* bereitet) wurden:

in Reihe A unter Zusatz von je 0,25 ccm zehnfach verdünnten Cholesterin-Antiserums,

in Reihe B unter Zusatz von je 0,25 ccm physiologischer Kochsalzlösung

mit je 0,25 ccm zehnfach in 1,7 proz. Kochsalzlösung verdünnten Meerschweinchenserums 1 Stunde in der Kälte digeriert. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Amboceptorverdünnung.

Die eingetretene und nach verschiedenen Zeiten (α, β, γ) eingetretene Hämolyse ist aus Tabelle VI ersichtlich:

Wie die Tabelle VI zeigt, *genügen also auch hier außerordentlich geringe Cholesterinmengen zum Nachweis der komplementbindenden Funktion.* Bei frühzeitiger Ablesung tritt noch mit $^1/_{600}$ mg Komplementbindung ein, und selbst unter Berücksichtigung der eingetretenen Nachhämolyse ist die Reaktion noch mit $^1/_{30}$ mg Cholesterin vollständig positiv. *Es gelingt also mittels der verwendeten Antisera nicht*

Tabelle VI.

Mengen des $^1/_6$ proz. Cholesterins ccm	Hämolyse von Hammelblut durch Amboceptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Cholesterin und					
	A Cholesterin-Antiserum			B ohne weiteren Zusatz		
	α	β	γ	α	β	γ
0,25	0	0	0	0	0	0
0,15	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	st.	c.	c.
0,03	0	0	0	c.	c.	c.
0,02	0	0	0	c.	c.	c.
0,01	0	0	Sp.	c.	c.	c.
0,006	0	0	m.	c.	c.	c.
0,004	0	Spch	c.	c.	c.	c.
0,002	0	Sp.	c.	c.	c.	c.
0,0008	0	w.	c.	c.	c.	c.
0	c.	c.	c.	c.	c.	c.

nur Lecithin und Cholesterin zu unterscheiden, sondern auch den Nachweis der Lipoide in sehr geringen Mengen zu führen.

Zusammenfassung.

Durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Lecithin bzw. Cholesterin im Verein mit Schweineserum gelingt es, Antisera zu erhalten, die mit den entsprechenden Lipoidstoffen durch Komplementbindung (außerdem auch durch Ausflockung) charakteristisch reagieren und so eine serologische Unterscheidung der Lipoide ermöglichen.

Untersuchungen über die hormonale Regulation des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels.

II. Mitteilung:

Demonstration des Insulin-Adrenalin-Antagonismus am lebenden Frosch.

Von

Alfred Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 27. April 1925.)

In der ersten Mitteilung[1]) war mit Hilfe des *Neuberg*schen Abfangverfahrens[2]) gezeigt worden, daß Adrenalin und Insulin den Kohlenhydratumsatz überlebender Leber- und Muskelzellen warmblütiger Tiere in antagonistischer Weise beeinflussen. Während Beigabe von Insulin die Bildung des Oxydationsproduktes Acetaldehyd durch Gewebebrei vermehrt, hemmt Adrenalin die Entstehung dieser Zwischenstufe im oxydativen Zuckerabbau. Bei gleichzeitigem Zusatz von Insulin und Adrenalin zu überlebenden Warmblüterzellen ist der Effekt auf die Aldehydproduktion eine Resultante der Insulin- und Adrenalinwirkung. Aus diesen Versuchsergebnissen war geschlossen worden, daß Insulin jene Fermentprozesse begünstigt bzw. ermöglicht, durch die die Umwandlung der stabilen, von der Zelle nicht verwertbaren furoiden Glucose — unter intermediärer Beteiligung anorganischer Phosphorsäure — in die ihrer Struktur nach unbekannte[3]) labile Reaktionsform des Zuckers vollzogen wird[4]). Adrenalin hingegen

---

[1]) *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **155**, 348, 1925.

[2]) *C. Neuberg*, Zeitschr. f. Botanik **11**, 180, 1918.

[3]) Vgl. hierzu auch *F. Laquer*, Klin. Wochenschr. **4**, 560, 1925.

[4]) Auf die Beziehungen zwischen Insulin und Koferment, für die auch *Brugsch* und *Horsters* (diese Zeitschr. **155**, 459, 1925) neuerdings Hinweise beigebracht haben, soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Verwiesen sei auf *Gottschalk*, Sitzung der Wiener biologischen Gesellschaft vom 9. Februar 1925; Wien. klin. Wochenschr. 1925, Nr. 14, sowie *Gottschalk*, Der Kohlenhydratumsatz in tierischen Zellen in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2. Aufl. Bd. II, B V. Jena 1925.

hemmt diese einleitenden Phasen des Kohlenhydratumsatzes. Die Beschleunigung bzw. Hemmung des oxydativen Zuckerabbaus, wie sie in der Vermehrung bzw. Verminderung abfangbaren Acetaldehyds zum Ausdruck kommt, ist die Folge des vermehrten bzw. verminderten Angebots an abbaufähiger Hexose.

Im Hinblick auf die engen Beziehungen, die zwischen Kohlenhydratumsatz und Motilität (im weitesten Sinne) bestehen, lag es nahe, in Versuchen am lebenden Tier die motorischen Funktionen des Organismus als Indikator für die antagonistische hormonale Regulation des intermediären Zuckerstoffwechsels zu benutzen. In der Tat gelingt es, *die Insulinkrämpfe des Frosches durch nachfolgende Adrenalininjektion zu lösen bzw. durch vorangehende Adrenalineinspritzung hintanzuhalten.*

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Die Frösche (Wintertiere) waren zum mindesten 3 Tage lang vor Versuchsbeginn bei 20° gehalten worden. Das benutzte Pankreasinkret war Insulin Booth Brand, das Nebennierenpräparat Suprarem. hydrochl. 1 : 1000 Höchst.

Rana temporaria, ♂, 32 g Gewicht.

Erhält subkutan (in den Rückenlymphsack) 25 Einheiten *Insulin.*

Nach 30 Minuten Streckkrämpfe der Gliedmaßen;
„ 60 „ sehr heftige Streckkrämpfe;
„ 90 „ „ „ „
„ 2 Stunden spontane Zuckungen, die auf Berührungsreize hin zu Krämpfen gesteigert werden;
„ 3 Stunden noch deutlich übererregbar.

Rana temporaria, ♂, 41 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin.*

Nach 30 Minuten stark übererregbar; keine spontanen Zuckungen, jedoch auf schwache Berührungsreize hin heftige klonische Krämpfe der Vorder- und Hinterbeine;
„ 90 Minuten spontan heftige Krämpfe;
„ 2 Stunden „ „ „
„ 4 „ lassen die Spontankrämpfe nach; auf Berührung hin jedoch klonische Zuckungen.

Rana temporaria, ♂, 39 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin.*

Nach 30 Minuten heftige Streckkrämpfe;
„ 60 „ „ „
„ 90 „ „ „
„ 2 Stunden klonische Zuckungen;
„ 3 „ fasciculäre Zuckungen in einzelnen Muskelgruppen;
„ 4 „ keine Spontanzuckungen mehr, jedoch noch deutlich übererregbar; Frosch bewegt sich spontan nicht.

Rana temporaria, ♀, 43 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin*.
Nach 30 Minuten Streckkrämpfe;
„ 60 „ „
„ 2 Stunden spontane Zuckungen, die auf mechanische Reize hin zu Streckkrämpfen gesteigert werden;
„ 3 Stunden noch deutlich übererregbar;
„ 4 „ kaum noch erregbar.

Wie aus den Protokollen ersichtlich ist, erzeugen hohe Insulindosen (40 bis 50 Einheiten pro 50 g Körpergewicht) beim Frosch innerhalb drei Stunden deutlich wahrnehmbare Streckkrämpfe (Außentemperatur 20°). Die Frösche sterben in diesem Krampfstadium nicht; vielmehr überleben nach unseren Erfahrungen die meisten Tiere den Eingriff. Ein kleiner Teil der Frösche geht zugrunde, aber nicht im Exzitationsstadium, sondern in einem auf dasselbe folgenden Zustand der Lähmung. Applikation geringer Mengen des Pankreasinkrets (etwa 20 Einheiten pro 50 g Körpergewicht) bleibt innerhalb der ersten 6 bis 8 Stunden post injectionem bei einer Außentemperatur von 20° ohne sichtbare Wirkung, wie in zahlreichen Vorversuchen festgestellt wurde.

Diese weitgehende Unempfindlichkeit der Kaltblüter gegen kleine und mittelgroße Insulindosen ist bereits früheren Untersuchern aufgefallen [*Macleod*[1]), *Noble* und *Macleod*[2]), *Krogh*[3]), *Bissinger*, *Lesser* und *Zipf*[4]), *v. Issekutz*[5]), *Mann*, *Bollman* und *Magath*[6]), *Houssay* und *Rietti*[7]), *Olmsted*[8]), *Abderhalden* und *Wertheimer*[9]), *Laufberger*[10]), *Gabbe*[11])]. Die Gründe für dieses Verhalten sind nicht hinreichend geklärt. Meist hat man die geringe Intensität des Stoffumsatzes der Kaltblüter dafür verantwortlich gemacht. Ebenso wie bei Säugetieren tritt bei Fröschen nach Injektion geeigneter Insulinmengen Hypoglykämie auf [*Mann*, *Bollman* und *Magath*[6]), *Houssay* und *Rietti*[7]), *Hemmingsen*[12]), *Gabbe*[11])].

---

[1]) *J. J. R. Macleod*, Insulin, Lecture to XIth Internat. Physiol. Congress. Edinburgh, July 1923.

[2]) *E. C. Noble* und *J. J. R. Macleod*, Journ. of physiol. **58**, 33, 1923.

[3]) *A. Krogh*, zitiert nach *J. J. R. Macleod*, l. c.

[4]) *E. Bissinger*, *E. J. Lesser* und *K. Zipf*, Klin. Wochenschr. **2**, 2233, 1923.

[5]) *B. v. Issekutz*, diese Zeitschr. **147**, 264, 1924.

[6]) *F. C. Mann*, *J. L. Bollman* und *T. B. Magath*, Amer. journ. of physiol. **68**, 115, 1924.

[7]) *B. A. Houssay* und *C. T. Rietti*, C. r. de la soc. de biol. **91**, 27, 1924.

[8]) *J. M. D. Olmsted*, Amer. journ. of physiol. **69**, 137, 1924.

[9]) *E. Abderhalden* und *E. Wertheimer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **203**, 439, 1924.

[10]) *V. Laufberger*, Klin. Wochenschr. **4**, 151, 1925.

[11]) *E. Gabbe*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **105**, 208, 1925.

[12]) *A. M. Hemmingsen*, Skand. Arch. f. Physiol. **46**, 56, 1924.

Nachdem durch die erste Versuchsreihe das regelmäßige Auftreten von Krämpfen bei Fröschen nach Applikation großer Insulinmengen erwiesen war, gingen wir zu *Kombinationsversuchen* Insulin + Adrenalin bzw. Adrenalin + Insulin am gleichen Tiere über.

Rana temporaria, ♂, 34 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin*.
Nach 30 Minuten heftigste Streckkrämpfe;
„ 45 „ „ „
subkutan 0,5 ccm *Adrenalin*.
„ 60 Minuten nur noch spärlich Zuckungen;
„ 75 „ spontan keine Zuckungen mehr; jedoch noch übererregbar;
„ 90 Minuten spontan keine Zuckungen; übererregbar;
„ 2 Stunden normales Verhalten.

Rana temporaria, ♀, 38 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin*.
Nach 30 Minuten Streckkrämpfe;
„ 60 „ „
subkutan 0,5 ccm *Adrenalin*;
„ 90 Minuten nur noch mäßige Übererregbarkeit vorhanden; spontan kein abnormes motorisches Verhalten;
„ 2 Stunden völlig normales Verhalten;
„ 3 „ „ „ „

Rana temporaria, ♂, 35 g Gewicht.

Erhält subkutan 40 Einheiten *Insulin*.
Nach 40 Minuten Streckkrämpfe;
„ 90 „ „
„ 2 Stunden „
subkutan 0,5 ccm *Adrenalin*;
„ 2½ Stunden keine Krämpfe mehr, jedoch noch übererregbar;
„ 3 „ normales Verhalten;
„ 4 „ „ „

Rana temporaria, ♀, 34 g Gewicht.

Erhält subkutan 0,5 ccm *Adrenalin*.
Nach 40 Minuten völlig gelähmt; auf mechanische Reize hin keine Reaktionen;
„ 60 Minuten gleiches Verhalten;
subkutan 20 Einheiten *Insulin*.
„ 80 Minuten deutliche Reaktion auf Reize, jedoch noch keine Spontanbewegungen;
„ 90 Minuten bewegt sich wieder spontan;
„ 2 Stunden normales Verhalten;
„ 3 „ „ „
„ 4 „ „ „

Rana temporaria, ♂, 37 g Gewicht.

Erhält subkutan 0,5 ccm *Adrenalin.*
Nach 45 Minuten vollständig gelähmt; auf Reize reaktionslos;
„ 60 „ „ „ „ „ „
subkutan 20 Einheiten *Insulin.*
„ 90 Minuten, reagiert gut auf äußere Reize;
„ 2 Stunden Spontanbewegungen; völlig normales Verhalten;
„ 3 „ „ „ „ „

Rana temporaria, ♂, 36 g Gewicht.

Erhält subkutan 0,5 ccm *Adrenalin.*
Nach 40 Minuten gelähmt; schlaff; reaktionslos;
„ 50 „ subkutan 20 Einheiten *Insulin*;
„ 75 „ bewegt sich spontan nicht, reagiert jedoch auf Berührungsreize hin gut;
„ 90 Minuten, beginnt sich spontan zu bewegen;
„ 2 Stunden normales Verhalten;
„ 3 „ „ „

Rana temporaria, ♀, 40 g Gewicht.

Erhält subkutan 0,5 ccm *Adrenalin.*
Nach 60 Minuten völlig gelähmt; schlaff; reaktionslos;
subkutan 20 Einheiten *Insulin.*
„ 90 Minuten Spontanbewegungen; auf äußere Reize prompte Reaktion;
„ 100 Minuten subkutan 20 Einheiten *Insulin.*
„ 2 Stunden übererregbar; keine spontane Zuckungen;
„ 3 „ „ „ „ „
„ 4 „ „ „ „ „
„ 6 „ normales Verhalten.

Die lediglich mit Adrenalin gespritzten Frösche zeigten durchgehends das folgende Verhalten:

Rana temporaria, ♂, 33 g Gewicht.

Erhält subkutan 0,5 ccm *Adrenalin.*
Nach 35 Minuten vollständig gelähmt; schlaff; ohne Reaktion auf Berührungsreize;
„ 60 Minuten gleiches Verhalten;
„ 2 Stunden, liegt schlaff da; auf stärkste mechanische Reize hin nur geringfügige Abwehrbewegungen;
„ 3 Stunden keine Spontanbewegungen; auf Reize träge Reaktion.

Die in den Protokollen wiedergegebenen Versuche zeigen deutlich, daß die Insulinkrämpfe des Frosches durch nachfolgende Adrenalineinspritzung schnell gelöst werden; ferner erweisen sie die prophylaktische Wirkung einer Adrenalinvorbehandlung gegenüber nachfolgender Insulinzufuhr. Injektion von Adrenalin allein bedingt beim Frosch eine lang anhaltende motorische Lähmung, deren Entstehungsmechanismus nicht klarliegt. Der Antagonismus der beiden die intermediäre Kohlenhydratverwertung beherrschenden Inkrete Insulin und Adrenalin ist demnach ein im Tierreich weithin verbreiteter.

Verbrennungswert und Elementaranalyse der tierischen Fette.

Von

Fr. W. Krzywanek.

(Aus dem vet.-physiologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 26. April 1925.)

In seinem Beitrag: Methodik des Stoffwechsels in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden bringt *Johansson*[1]) auch die Werte für die Elementaranalyse und den Verbrennungswert der Fette, mit denen heute bei Stoffwechselversuchen gerechnet wird. Bei der Lektüre dieses Abschnitts fällt es auf, daß, trotzdem in den letzten Jahrzehnten eine Verfeinerung sämtlicher Stoffwechselmethoden angestrebt und zum größten Teil auch erzielt worden ist, diese wichtigen Standardzahlen in der neuesten Zeit keine Nachprüfung erfahren haben. So ist z. B. für das tierische Fett nur eine Mittelzahl angegeben, die, wenn auch nur wenig, von der für das menschliche Fett angegebenen abweicht. Diese Zahl für den Energiewert des tierischen Fettes ist ein Mittelwert aus zwei Zahlen, die *Rubner* 1885 und *Stohmann* und *Langbein* 1890 angegeben haben. Die Werte für den Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäureproduktion bei der Verbrennung des Fettes stammen von *Zuntz* aus dem Jahre 1897. Außerdem wurden die Fette nicht allein, sondern nach dem Stande der damaligen Methodik mit Zusatz von chlorsaurem Kali als Zündstoff verbrannt, wobei mehrere Fehlerquellen gegeben waren, die mit der heutigen Methodik ausgeschaltet sind.

Es erscheint auch merkwürdig, daß sämtliche tierischen Fette dieselben Werte bei der Verbrennung ergeben sollen und daß davon nur das menschliche Fett eine Ausnahme machen soll. Diese Gründe bewogen mich, eine Nachprüfung der Verbrennungswerte der für den Stoffwechselversuch in Betracht kommenden Tierarten mit der modernen Methodik und gleichzeitig eine Bestimmung ihrer Zusammensetzung mit Hilfe der kalorimetrischen Bombe vorzunehmen.

Das zur Untersuchung kommende Fett wurde mit Ausnahme des Hundefetts, das aus dem hiesigen pathologischen Institut stammte,

---

[1]) *Johansson*, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 9, Heft 3, 1924, S. 331–366.

auf dem Schlachthofe frisch geschlachteten Tieren entnommen. Dabei wurden von derselben Tierart mehrere in ihrem Alter und Ernährungszustand verschiedene Tiere ausgewählt und bei jedem Tiere das Fett von den verschiedensten Körpergegenden entnommen. Die so gewonnenen Fettportionen wurden im Laboratorium zerkleinert, vorsichtig ausgeschmolzen und durch den Warmwassertrichter filtriert. Dann wurde zur Vertreibung des Wassers noch mehrere Stunden im Vakuum gekocht und das Fett im Vakuumexsikkator erstarren gelassen. Die Verbrennung des so gewonnenen wasserfreien Fettes machte zunächst einige Schwierigkeiten. Am günstigsten erwies es sich im Laufe der Versuche, das Fett auf den Boden des zur Verbrennung dienenden Platinschälchens zu wiegen und dann das Schälchen mit dem Boden nach oben, also verkehrt, in die Bombe zu bringen. Der Zünddraht wurde zu einer feinen Spirale aufgewickelt und diese mit Hilfe einer Pinzette möglichst in ihrer ganzen Ausdehnung in das Fett versenkt. Auf diese Weise gelang die Verbrennung in den meisten Versuchen vollständig; Versuche, in denen ein Rückstand blieb, wurden verworfen. Das Pferdefett erwies sich als so dünnflüssig, daß es auf dem Boden des Platinschälchens nicht zu erhalten war, sondern abfloß. Bei dieser Fettart wurde daher das Fett in das aufrecht stehende Schälchen hineingewogen und die Zündung erfolgte mit einem kleinen Stück Zwirnsfaden, der von dem Zünddraht in das Fett hineintauchte. Das zu den Versuchen dienende Kalorimeter war im letzten Jahre von der Firma Hugershoff, Leipzig, neu geliefert, die Bombe ist mit Platin ausgekleidet und hat bei einem Fassungsvermögen von 261,04 ccm ein Gewicht von 2388,076 g. Die Bestimmung der produzierten Kohlensäure und des verbrauchten Sauerstoffs geschahen nach der *Zuntz*schen Methode, wie sie von *Klein* und *Maria Steuber*[1]) ausgearbeitet und beschrieben worden ist.

Die Übersichtstabelle bringt eine Zusammenstellung der gefundenen Werte für 1 g wasserfreies Fett berechnet. Zum Vergleich sind außerdem die von *Johansson* angegebenen Werte angeführt. Als Kontrolle für die Genauigkeit der Methode sind ferner zwei Verbrennungen von Rohrzucker (*Mercks* Präparat von bestimmter Verbrennungswärme) am Schluß der Tabelle angefügt; die gute Übereinstimmung der gefundenen und berechneten Werte bürgt für die Genauigkeit der Methode.

Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wäre zu bemerken, *daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Fettarten zwar nicht sehr erheblich, doch immerhin so eindeutig sind, daß es sich empfehlen dürfte, bei der Berechnung von Stoffwechselversuchen künftig auf diese je nach der betreffenden Tierart zurückzukommen.*

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 81–89, 1921.

Tierart	CO_2-Produktion		O_2-Verbrauch		R.-Q.	Kalorien
	g	Lt	g	Lt		
Pferdefett	2,8396	1,4451	2,9074	2,0343	0,710	9459,5
	2,8481	1,4494	2,9145	2,0392	0,711	9462,2
	2,8365	1,4435	2,9153	2,0399	0,708	9459,5
	2,8422	1,4464	2,9053	2,0328	0,712	9456,5
	2,8412	1,4495	2,9056	0,0330	0,711	9452,8
Im Mittel	**2,8417**	**1,4461**	**2,9096**	**2,0358**	**0,710**	**9458,1**
Rinderfett	2,8205	1,4354	2,8957	2,0261	0,708	9498,6
	2,8332	1,4419	2,8736	2,0107	0,717	9497,5
	2,8197	1,4350	2,9055	2,0330	0,706	9512,6
	2,8230	1,4367	2,8834	2,0175	0,712	9514,0
	2,8220	1,4362	2,8830	2,0171	0,712	9502,0
Im Mittel	**2,8237**	**1,4370**	**2,8882**	**2,0209**	**0,711**	**9505,0**
Hammelfett	2,8233	1,4368	2,8500	1,9941	0,720	9444,2
	2,8223	1,4363	2,8506	1,9945	0,720	9449,8
	2,8206	1,4354	2,8415	1,9881	0,722	9453,4
	2,8235	1,4369	2,8528	1,9961	0,720	9448,6
	2,8253	1,4378	2,8430	1,9893	0,723	9452,6
Im Mittel	**2,8275**	**1,4366**	**2,8476**	**1,9924**	**0,721**	**9449,7**
Schweinefett	2,8524	1,4516	2,8672	2,0062	0,724	9497,5
	2,8421	1,4464	2,8804	2,0154	0,718	9510,4
	2,8506	1,4507	2,8703	2,0087	0,722	9516,6
	2,8330	1,4417	2,8867	2,0198	0,714	9519,0
	2,8445	1,4476	2,8800	2,0151	0,718	9501,6
Im Mittel	**2,8445**	**1,4476**	**2,8769**	**2,0130**	**0,719**	**9509,0**
Hundefett	2,8330	1,4417	2,8567	1,9989	0,721	9473,8
	2,8367	1,4436	2,8480	1,9928	0,724	9488,6
	2,8341	1,4423	2,8540	1,9969	0,722	9493,0
	2,8275	1,4390	2,8470	1,9920	0,722	9489,8
	2,8341	1,4423	2,8460	1,9913	0,724	9484,4
Im Mittel	**2,8331**	**1,4418**	**2,8503**	**1,9944**	**0,723**	**9485,9**
Tierisches Fett *)	2,81	1,43	2,89	2,02	0,707	9460
Menschlich.Fett*)	2,79	1,42	2,85	1,99	0,711	9540
Rohrzucker	1,5370	0,7822	1,1200	0,7837	0,998	3952,4
	1,5507	0,7891	1,1245	0,7868	1,003	3955,9
Im Mittel	**1,5439**	**0,7857**	**1,1223**	**0,7853**	**1,001**	**3954,2**
Berechnet	**1,5435**	**0,7852**	**1,1222**	**0,7852**	**1,000**	**3952,0**

*) Diese Zahlen sind dem zitierten Aufsatz von *Johansson* entnommen.

Autorenverzeichnis.









